



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie moléculaire des microorganismes

Intitulé :

**Essai de bioépuration des sols contaminés aux hydrocarbures
pétroliers par *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia
marcescens***

Présenté et soutenu par : Bouazza Amina Yasmine

Le : 04/07/2019

Tedjari Ryma Khadidja

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Mme Bouchloukh Warda (Maitre assistante <<A>> à UFC)

Rapporteuse : Mme Guergouri Ibtissem (Maitre assistante <<A>> à UFC)

Examinatrice : Mme Gaci Meriem (Maitre assistante <<A>> à UFC)

*Année universitaire
2018 – 2019*

Remerciements

Merci à Allah de nous avoir aidé à réaliser ce modeste travail.

Nous tenons à remercier Mme Guergouri Ibtissem qui nous a encadrées tout au long de ce travail en nous faisant bénéficier de ses connaissances scientifiques et de ses conseils. Nous lui exprimons notre profonde gratitude pour l'aide qu'elle nous a fournie pour la réalisation de ce travail, qu'elle veuille trouver ici l'expression de notre profond respect et de notre sincère reconnaissance.

Nous remercions également Mme Bouchloukh Warda pour l'honneur qu'elle nous fait d'avoir accepté de juger ce travail et de présider le jury de ce mémoire.

Merci à Mme Gaci Meriem de m'avoir fait l'honneur de se joindre au jury et d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Nous devons également remercier l'ensemble du personnel du laboratoire de microbiologie générale.

Finalement, nous exprimons notre profonde reconnaissance de gratitude aux personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace

A

Mes très chers parents,

En témoignage de mon profond amour et mon plus grand respect. Je ne vous remercierais jamais assez pour votre soutien tout au long de ma scolarité.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien-être. Votre chaleur a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation.

A

Mes Frères,

Pour toute l'affection que vous m'avez toujours témoignée, je vous souhaite une vie pleine de bonheur, de gloire, de triomphe et de succès.

A

Mon fiancé,

Pour ton amour, soutien, disponibilité et encouragement.

A

Mes meilleures amies,

Louza, Rayen, Lina, Milka et Ferial pour tous les moments que nous avons partagés durant ces années des plus difficiles aux meilleurs, en espérant pouvoir en partager encore tant d'autres.

A

Mes proches, mes cousins, mes cousines et toute la famille Bouazza.

A tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

Que Dieu vous réserve bonne santé, bonheur et longue vie

Yasmine

Dédicaces

A l'amour de ma vie, la source de mon bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir heureuse. A mon papa, la personne qui m'a appris à avancer dans la vie.

A la lumière de mes jours ; ma très chère maman que j'aime.

A ma meilleure amie Rania Djoudi.

A toi Alyae...

Ryma

Résumé

L'accumulation des hydrocarbures pétroliers dans le sol présente un véritable danger pour l'environnement et la santé humaine. La bioremediation est une option qui offre la possibilité de dégrader ces polluants ou de les rendre moins toxiques, en se basant sur l'activité épuratrice naturelle des microorganismes.

L'objectif de cette étude est dépolluer deux types de sol contaminés par le pétrole et le kérosène en faisant appel à la flore indigène et à des souches bactériennes exogènes isolées à partir d'un site contaminé par les hydrocarbures.

Au total, cinq bacs de sol sont artificiellement pollués par le pétrole et le kérosène séparément, dont deux bacs ont subi un traitement de bioaugmentation, deux autres non traités et enfin, un bac est réservé à un sol témoin non pollué.

Un consortium bactérien composé de trois souches est injecté dans les traitements de bioaugmentation. Les souches inoculées sont une *Serratia marcescens* et deux *Pseudomonas aeruginosa*.

L'efficacité de cette démarche est évaluée par le suivi de la charge microbienne UFC/g et surtout d'un test de germination chaque 15 jours durant les 45 jours d'expérimentation.

Les résultats obtenus après 45 jours sont importants et montrent des indices de germination de 66.35%, 84.27% pour l'atténuation naturelle, et la bioaugmentation des sols pollués par le pétrole et 24.33%, 33% pour l'atténuation naturelle et la bioaugmentation des sols pollués par le kérosène respectivement.

Mots clés : bioaugmentation, pétrole, kérosène, graines d'orge, flore indigène, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*.

Abstract

The accumulation of petroleum hydrocarbons in the soil is actually a real threat for both the environment and the public health. Bioremediation is an option which offers the possibility of either degrading these harmful pollutants or turning them into less toxic ones based on the natural purification activities of microorganisms.

The objective of this study is to clean up two types of contaminated soil by petroleum and kerosene using indigenous flora and exogenous bacterial strains isolated from a site that is contaminated by the hydrocarbons.

Altogether, five tanks of soil are artificially contaminated by petroleum and kerosene one at a time two of these tanks have been submitted to a bioaugmentation treatment

The two other tanks were not treated the last tank is kept for non polluted soil.

A bacterial Consortium composed of three strains is injected in the treatment of bioaugmentation. The inoculated strains are *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa*.

The effectiveness of this approach is evaluated by the follow-up of the microbial charge CFU/g, as well as a germination test every 15 days for the 45 days of the experiment.

The results obtained after 45 days are important. They show the ability of microorganisms to decompose petroleum and kerosene with a germination index of 66.35%, 84.27% for natural attenuation and bioaugmentation of polluted soil by the petroleum, and 24.33%, 33% for natural attenuation and bioaugmentation of polluted soil by the kerosene, respectively.

Key words: bioaugmentation, petroleum, kerosene, barley seeds, indigenous flora, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*.

ملخص

يشكل تراكم الهيدروكربونات البترولية في التربة خطرا حقيقيا محدقا بالبيئة وبصحة الإنسان لذلك تم اللجوء الى العلاج الحيوي والذي يمثل الخيار الامثل اذ انه يوفر إمكانية ازالة هذه الملوثات أو جعلها أقل سمية باستخدام قدرة الكائنات الحية الدقيقة على تفكيك هذه الملوثات.

الهدف من هذه الدراسة هو اصلاح واعادة تأهيل نوعين من التربة الملوثة بالبترول والكيروسين باستخدام كائنات جرثومية أصلية وسلالات بكتيرية خارجية معزولة من مواقع ملوثة بالهيدروكربون.

اجمالا، تم تلويث خمسة اوعية تحتوي على التربة بالبترول والكيروسين كل على حدى و تمت معالجة وعائين منها بتقنية الاصلاح الحيوي اما العلبتين المتبقيتين لم تتم معالجتهم (التصفية الطبيعية للأتربة الملوثة بالبترول و الكيروسين) واما الوعاء الخامس فهي مخصصة للتربة الشاهدة غير الملوثة .

تم حقن خليط جرثومي متكون من ثلاث سلالات داخل الأوعية المخصصة للإصلاح الحيوي. السلالات هي *Serratia marcescens* و سلالتين *Pseudomonas aeruginosa* .

تم تقييم نجاعة هذه التجربة بتتبع تغير قيم العدد الجرثومي UCF/g بالإضافة الى اجراء اختبار الانبات على مستوى الأوعية الخمس مرة كل أسبوعين لمدة 45 يوم من التجربة.

النتائج المحصل عليها بعد 45 يوم من التجربة ذات دلالة وتبرز مؤشرات انبات % 84.27, % 66.35 بالنسبة لعلاجات الاصلاح الحيوي و التصفية الطبيعية للأتربة الملوثة بالبترول و % 33, % 24.33 بالنسبة لعلاجات الاصلاح الحيوي و التصفية الطبيعية للأتربة الملوثة بالكيروسين.

الكلمات المفتاحية : اثناء حيوي , بترول , كيروسين , حبوب الشعير, كائنات جرثومية أصلية ,

Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Résumés	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste d'abréviations	
Introduction.....	01

PARTIE 01 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Pollution des sols par les hydrocarbures pétroliers

1. Le pétrole	3
1.1 définition	3
1.2 Origine du pétrole.....	3
1.3 Composition du pétrole.....	3
1.4 Principaux produits de raffinage du pétrole	4
1.4.1 Le kérosène.....	5
1.4.2 Définition.....	5
1.5 Toxicité des hydrocarbures pétroliers	6
2. le sol	7
2.1 Définition	7
2.2 Composition	7
2.2.1 Phase liquide.....	8
2.2.2 Phase gazeuse	8
2.2.3 phase solide	8
3. La microflore du sol.....	8
3.1 Répartition des microorganismes dans le sol	8
4. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement	9

Chapitre II : les différentes techniques de réhabilitation des sols pollués

1. Méthode physique	11
2. Méthode chimique	11
3. méthode thermique	11
4. Méthode biologique	11
4.1 La phytoremediation	12
4.2 La bioremediation	12
4.2.1 L'atténuation naturelle	13
4.2.2 La bioaugmentation	13
4.2.3 Facteurs influençant la bioremediation	13
5. Nouvelle méthode	14
5.1 L'électrocinétique-bioremediation	14
5.2 L'application du génie génétique	15
6. Avantages et inconvénients de la bioremediation	15

Chapitre III : La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes

1. La biodégradation	17
1.1 Les microorganismes impliqués dans la biodégradation.....	18
1.2 Les bactéries	18
1.2.1 La biodégradation par le genre <i>Pseudomonas</i>	19
1.2.2 la biodégradation l'espèce <i>Serratia marcescens</i>	20
1.2.3 Mode d'accession aux hydrocarbures par la cellule bactérienne.....	21
1.2.4 Adaptation génétique des bactéries	22
1.3 Les champignons	22
1.4 L'activité enzymatique impliquée dans la biodégradation.....	23
2. Les voies métaboliques de dégradation des hydrocarbures pétroliers	24
2.1 La biodégradation aérobie	24
2.1.1 minéralisation	24
2.1.2 Co-métabolisme	24
2.2 La biodégradation anaérobie	24

PARTIE 02 : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I : Matériel et méthodes

1. Le sol	25
1.1 Les sites d'échantillonnage	25
1.2 Méthode d'échantillonnage	25
1.3 Préparation du sol	25
2. Les polluants	27
2.1 La préparation des polluants.....	27
3. Les souches bactériennes utilisées	28
3.1 Caractérisation macroscopique et microscopique	28
3.1.1 Aspect macroscopique	29
3.1.2 Aspect microscopique	29
3.2 Préparation de l'inoculum	30
4. La bioremediation des sols pollués par le pétrole et le kérosène	30
5. Le suivie de la bioremediation	30
5.1 Irrigation et retournement	32
5.2 suivi de la biomasse microbienne	32
5.3 évaluation de la charge microbienne	33
6. Test de germination	34
6.1 La longueur des parties aériennes et racinaires	34
6.2 L'indice de germination	35

Chapitre II : Resultats et Discussion

1. Caractérisation des souches dégradant les hydrocarbures.....	36
1.1 Aspect macroscopique.....	36
1.2 Aspect microscopique.....	36

2. Le suivi de la bioremediation.....	38
2.1 L'évolution de la biomasse bactérienne.....	38
3. Test de germination	40
3.1 La longueur des parties aériennes et racinaires	41
3.2 L'indice de germination.....	41
4. Interprétation.....	43
4.1 dénombrement microbien.....	43
4.2 test de germination.....	45
5 Discussion	47
Conclusion et perspective	50
Références bibliographique	53
Annexe	

Liste des figures

Figure 1	Illustration schématique du processus de formation du pétrole.....	4
Figure 2	Le processus du raffinage.....	5
Figure 3	Proportion des principaux composants du sol.....	7
Figure 4	Illustration schématique du devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol	10
Figure 5	Les différentes stratégies de phytoremediation.....	12
Figure 6	Le principe de l'électrocinétique-bioremediation	14
Figure 7	Mécanisme général de biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes.....	17
Figure 8	Réseau de dégradation du pétrole par la bactérie.....	18
Figure 9	Mécanisme d'accession des microorganismes aux hydrocarbures.....	22
Figure 10	Les réactions enzymatiques impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures.....	23
Figure 11	Photographie du premier site de prélèvement (Université des frères Mentouri).....	26
Figure 12	Photographie du deuxième site du prélèvement (Plage d'Ain Achir).....	26
Figure 13	Les étapes de préparation des deux échantillons du sol (broyage et tamisage).....	27
Figure 14	Filtration du polluant.....	28
Figure 15	Le dispositif expérimental (a : les polluant + la suspension bactérien ; b : pollution du sol par le pétrole ; c : pollution du sol par le kérosène ; d : les bacs traités).	31
Figure 16	a et b : Irrigation des sol ; c : Retournement des sols.....	32
Figure 17	a : désinfection des grains d'orge ; b : semence des grains d'orge.....	35
Figure 18	Photographies de l'aspect macroscopique des souches bactériennes	37
Figure 19	Photographies de l'aspect microscopique objectif 100 des souches bactériennes.....	37
Figure 20	Dénombrements des souches bactériennes sur gélose nutritive (bioaugmentation pétrole à T45).....	38
Figure 21	Digramme en bâtonnets représentant l'évolution de la biomasse microbienne dans les échantillons du sol au cours des 45 j d'expérimentation.....	40
Figure 22	a : Résultat de la germination des grains dans le sol non pollué à T0 ; b : La longueur des racines et la partie aérienne..	41
Figure 23	Résultat de la germination de tous les grains dans le sol non pollué et pollué par le pétrole et le kérosène à T45.....	42
Figure 24	Diagramme en bâtonnets représentant l'indice de germination des grains d'orge semés dans le sol non pollué et pollué pendant les 45 j d'expérimentation.....	43

Liste des tableaux

Tableau 1	Formule chimique du kérosène conventionnel.....	6
Tableau 2	les groupes communs de micro-organismes présents dans le sol.....	9
Tableau 3	les principaux avantages et inconvénients de la bioremediation.....	16
Tableau 4	La taxonomie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
Tableau 5	La taxonomie de <i>Serratia marcescens</i>	20
Tableau 6	Les méthodes de bioremediation appliquées.....	31
Tableau 7	L'aspect macroscopique des colonies isolées sur gélose nutritive.....	36
Tableau 8	Les différents aspects microscopiques des souches bactériennes.....	36
Tableau 9	Nombre de microorganismes de chaque dilution du sol.....	39
Tableau 10	Dénombrement de la flore dans les échantillons du sol en UFC/g.....	40
Tableau 11	La moyenne des longueurs de la partie aérienne et racinaire de l'orge durant les 45 jours d'expérimentation...	42
Tableau 12	L'indice de germination des grains d'orge semés dans le sol non pollué et pollué Pendant les 45 j d'expérimentation	42

Liste des abréviations

ATT.K : Atténuation naturelle kérosène

ATT.P : Atténuation naturelle pétrole

BIO.K : Bioaugmentation kérosène

BIO.P : Bioaugmentation Pétrole

UFC : Unité formant colonies

INTRODUCTION

Introduction

Le développement des activités humaines est devenu aujourd'hui une menace pour l'environnement qui subit depuis plusieurs décennies des agressions majeures.

En effet, Le rejet des hydrocarbures d'origine pétrolière constitue l'un des problèmes de pollution les plus inquiétants du fait de leur toxicité sur l'homme et l'environnement (Ould boudia et Hammadi, 2011).

Les hydrocarbures pétroliers contiennent principalement des molécules composées d'atomes de carbone et d'hydrogène. Ils peuvent être divisés en quatre classes: Les saturés, les aromatiques, les asphaltènes (phénols, acides gras, cétones, esters et porphyrines) et les résines (pyridines, quinolines, carbazoles, sulfoxydes et amides) (Leahy et Colwell, 1990).

Ces polluants sont des composés hydrophobes dont la persistance dans les écosystèmes est principalement due à leur faible solubilité aqueuse. Leur présence dans les sols est généralement associée aux activités pétrochimiques (Le raffinage, le stockage et le transport des produits pétroliers)

Afin de préserver et de restaurer l'environnement et d'éliminer ces polluants, il est donc nécessaire de développer des méthodes fiables et efficaces de dépollution. Les méthodes physiques et chimiques sont appliqués afin d'immobiliser les hydrocarbures et de les détruire pour réduire leurs impacts sur la santé et sur l'environnement. La plupart de ces techniques sont coûteuses et non respectueuses de l'environnement (Azubuiké *et al.*, 2016). Toutefois, une approche biologique par bioremediation peut être envisagée. Elle utilise le pouvoir épurateur des microorganismes de l'environnement, et présente l'avantage d'être peu invasive et moins onéreuse (Nikitha *et al.*, 2017).

La bioremediation est l'utilisation de microorganismes pour détoxifier ou éliminer les polluants en raison de leurs diverses capacités métaboliques, c'est une méthode évolutive pour l'élimination et la dégradation de nombreux polluants environnementaux, y compris les produits de l'industrie pétrolière. La biodégradation par les populations naturelles de microorganismes représente l'un des principaux mécanismes par lesquels le pétrole et les autres polluants hydrocarbonés peuvent être éliminés de l'environnement (Kumar *et al.*, 2011).

L'objectif de la présente recherche est de réhabiliter deux types de sols contaminés volontairement au kérosène et au pétrole brut, en faisant appel à des souches bactériennes

hydrocarbonoclastes capables de dégrader les hydrocarbures pétroliers et comparer l'efficacité de ces techniques de bioremediation à savoir : l'atténuation naturelle et la bioaugmentation.

Notre mémoire comporte trois parties :

Dans une première partie : une revue bibliographique présente l'essentiel sur les hydrocarbures pétroliers, leur présence dans le sol, les différents techniques de réhabilitation des sols pollués et dernièrement la biodégradation de ces composés par les micro-organismes.

La présentation de la méthodologie développée au laboratoire pour réaliser cette expérimentation fait l'objet de la deuxième partie. En préambule, un échantillonnage et préparation du sol, sa contamination artificielle, introduction des souches. Puis, les différentes étapes de l'expérimentation (test de bioremediation, dénombrement, et le test de germination).

La dernière partie expose les résultats obtenus avec une interprétation et discussion et finalement une conclusion et perspective.

PARTIE 01 :

**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

Chapitre I : Pollution des sols par les hydrocarbures pétroliers

1. Le pétrole

1.1 Définition du pétrole

Le pétrole est une huile minérale naturelle, un liquide composé d'une multitude de composés organiques, essentiellement des hydrocarbures, piégé dans des formations géologiques particulières et dont la formation date d'environ 20 à 350 millions d'années.

Son nom est tiré du mot latin petroleum de *petra* = pierre et de *oleum* = huile, ce qui signifie littéralement "huile de pierre".

1.2 Origine du pétrole

Le pétrole brut est un liquide constitué principalement d'hydrocarbures, il est le retrouvé dans les bassins sédimentaires.

Le pétrole a pour origine la substance des êtres, animaux ou végétaux, vivant à la surface du globe et particulièrement en milieu aquatique. La matière organique ainsi produite se dépose au fond des mers et des lacs et est incorporée aux sédiments, comme le montre la figure 1. À mesure que ceux-ci sont enfouis, les constituants organiques se transforment, principalement sous l'action de la température, en hydrocarbures dont une partie vient progressivement se concentrer dans les pièges des réservoirs poreux (Tissout, 2019).

1.3 La composition du pétrole

Le pétrole a une formule assez complexe, il est composé d'un mélange organique de plusieurs hydrocarbures, d'azote, de soufre, de métaux et parfois d'eau salée. On en distingue trois types :

- **Premier type** : Hydrocarbures acycliques saturés

Également appelée hydrocarbures paraffiniques ou alcanes ; ils sont de formule générale C_nH_{2n+2} . Cette série est considérée comme la plus importante (Baltimore, 1962).

- **Deuxième type** : Hydrocarbures acycliques non saturés

Nommés hydrocarbures naphthéniques ; ils sont de formule générale C_nH_{2n} . Les carbones sont associés en anneau et toutes les valences sont saturées. Les cycles les plus rencontrés dans le pétrole brut sont ceux de 5 ou bien 6 atomes de carbone. (Rose et Cooper, 1977)

- **Troisième type** : Hydrocarbures cycliques non saturés

Connus sous le nom d'hydrocarbures aromatiques, ils sont de formule générale C_nH_{2n-6} . Ils comportent le cycle du benzène C_6H_6 , sur lequel d'autres chaînes carbonées peuvent s'ajouter (Perry et Chilton, 1973.,1984).

Le pétrole contient aussi d'autres composés à part les hydrocarbures tels que les composés soufrés, les composés acides $R-SH$ (les thiols), les composés non acides (les thiophènes) (Atlas et Bartha, 1972) ainsi que les composés oxygénés.

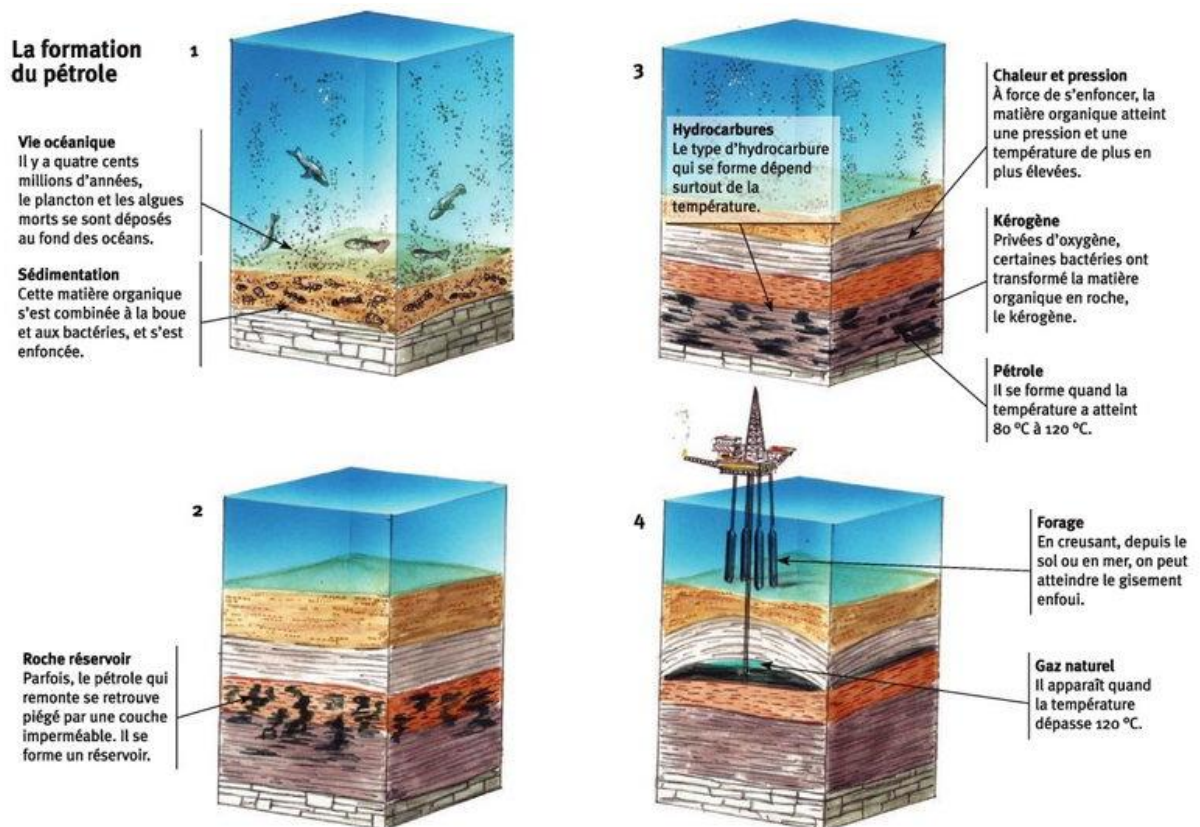


Figure 1: Illustration schématique du processus de formation du pétrole (M.C.M, 2006).

1.4 Principaux produits de raffinage du pétrole brut

Le pétrole est la première source d'énergie dans le monde depuis plusieurs années, il est à l'origine d'un nombre important de produits dérivés. Le raffinage du pétrole est un

procédé qui transforme un mélange d'hydrocarbures en produits énergétiques, tels que carburant et combustibles comme le kérosène (figure2).



Figure 2 : Le processus du raffinage (Deluzarche, 2006).

1.4.1 Le kérosène

1.4.2 Définition

Le kérosène est essentiellement destiné à l'alimentation des avions à réaction. Il est donc composé d'un mélange d'hydrocarbures distillant entre 140 et 300 °C, dont les principaux constituants sont des hydrocarbures de C9 à C16 (paraffiniques, iso-paraffiniques, naphthéniques et aromatiques) (Montagne, 2011)

La formule chimique du kérosène diffère d'une source à une autre, comme nous le montre le tableau suivant :

Tableau 01: formule chimique du kérosène conventionnel (Amir, 2011)

Sources	Formule chimique
Gracia-Salcedo et al	$C_{12}H_{13}$
Edwards et Maurice	$C_{11}H_{21}$
Martel	$C_{11,6}H_{22}$
Guéret	$C_{11}H_{22}$
Nguyen et Ying	$C_{11}H_{23}$

1.5 Toxicité des hydrocarbures pétroliers

Les hydrocarbures sont des polluants environnementaux ubiquitaires, dont certains sont connus par leurs effets toxiques, cancérigènes, génotoxiques, immunotoxiques, mutagéniques ou tératogéniques. Ils représentent une menace pour la santé publique.

Les symptômes de toxicité associés aux hydrocarbures peuvent être classés en deux catégories : les symptômes visibles et les symptômes uniquement mesurables ; leur importance étant fonction de la mobilité des hydrocarbures à l'interface sol-plante et à l'intérieur de la plante, mobilité qui détermine la concentration endogène des hydrocarbures (Korade *et al.*, 2009).

Parmi les symptômes visibles, les hydrocarbures induisent une inhibition de la croissance de différentes parties des plantes. Ainsi, ils produisent une réduction de la biomasse des différents organes chez des plants (Aoun, 2009).

2. Le Sol

2.1 Définition

Le sol désigne une succession de couches ou strates formé par la dégradation de roche mère et l'accumulation de matière organique résultant des activités biologiques (Jabiol *et al.*, 2011).

Les sols sont dynamiques et évoluent avec le temps. Le sol est l'habitat d'une variété d'organismes, y compris les bactéries, champignons, protozoaires, insectes, nématodes, des vers, et de nombreux autres animaux. Les virus sont également présents dans les sols (Prescott *et al.*, 1995).

2.2 Composition

Le sol est à l'interface de la lithosphère, l'atmosphère et l'hydrosphère sert de support à une partie de la biosphère (Gobat, 2003). Il comporte 3 phases distinctes : une phase liquide, une phase solide et une phase gazeuse (figure 3). Le sol se présente sous forme de couches qui ont une composition et des propriétés particulières. Leurs proportions varient en fonction de la nature du sol ainsi que son état hydrique.

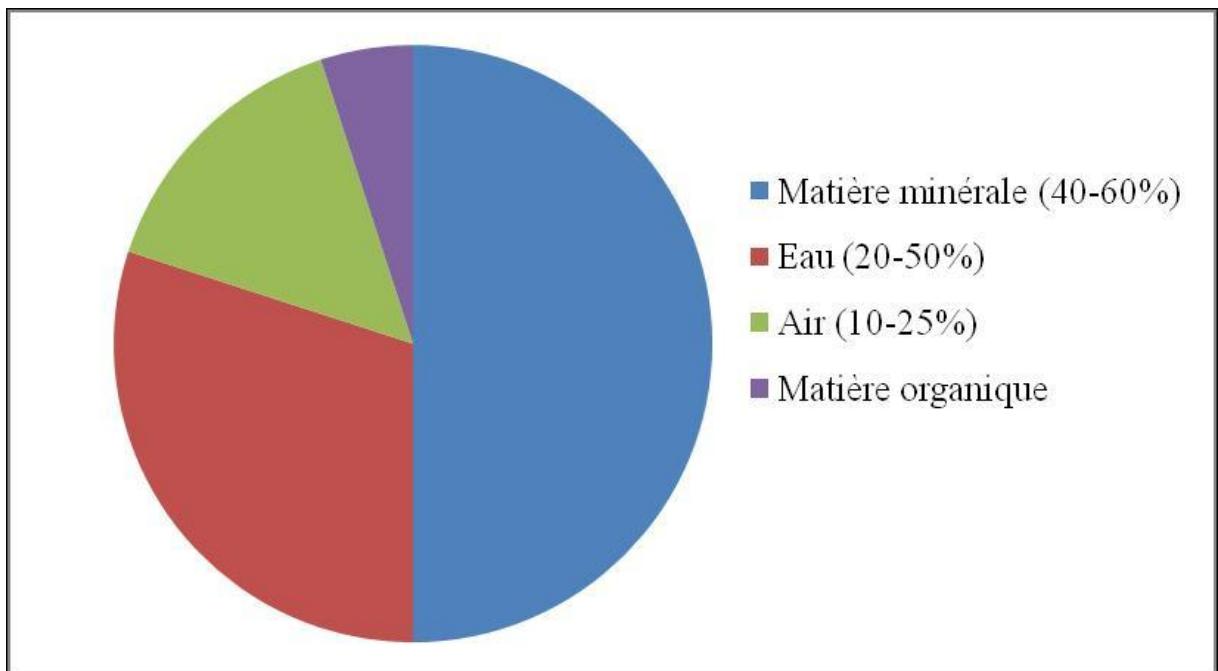


Figure 3: Proportion des principaux composants du sol (white, 2006)

2.2.1 Phase liquide

Le sol est un milieu poreux (50 % du volume total est occupé par des pores). L'eau issue des précipitations est généralement retenue dans les pores les plus fines. Par contre la phase liquide du sol n'est pas de l'eau pure mais une solution dont la composition est complexe et très variable. Cette fraction est le lieu des réactions chimiques permanentes indispensables à l'évolution et à la croissance des végétaux (Calvet, 2000).

2.2.2 La phase gazeuse

La fraction gazeuse du sol est nommée « l'atmosphère du sol » est composée des mêmes gaz que l'air auxquels s'ajoutent certains gaz provenant de la décomposition des MOS (matières organique du sol) (Muriel, 2007).

2.2.3 La phase solide

La phase solide du sol est constituée des minéraux solides et des matières organiques en proportions variables. Ces deux fractions interviennent principalement dans la sorption des polluants.

3. La Microflore du sol

Le sol est un environnement hétérogène complexe qui contient une grande variété de communautés et d'espèces bactériennes (Daniel, 2005).

L'activité microbienne est plus grande dans les couches superficielles du sol riches en matières organiques, en particulier dans et autour de la rhizosphère. Le nombre et l'activité des micro-organismes du sol dépendent dans une large mesure des quantités de nutriments présents. Les nutriments limitant dans les sols sont souvent les nutriments minéraux tels que le phosphore et l'azote (Mardigan *et al.*, 2012).

3.1 Répartition des micro-organismes dans le sol

C'est dans les litières, les horizons de surface et la rhizosphère des plantes que les micro-organismes sont beaucoup plus nombreux, où les conditions énergétiques et nutritionnelles sont favorables.

Parmi les micro-organismes présents dans le sol on retrouve les Bactéries, les Champignons, les Archéobactéries et les protistes. Le tableau suivant montre les groupes communs de micro-organismes présents dans le sol

Tableau 2: Les groupes communs de micro-organismes présents dans le sol
(Seagren et Aydilek, 2010).

Soil Type Based on Particle Size ^a (µm)	Microbial Group	Example Organism	Number per Gram of soil	Biomass (Kg wet mass /ha of soil)
Clay <2.0	Viruses	Tobacco Mosaic	10 ¹⁰ -10 ¹¹	
	Bacteria	Pseudomonas	10 ¹⁰ -10 ¹¹	300-3000
	Actinomycetes	Streptomyces	10 ⁸ -10 ⁹	300-3000
Slit 2.0-75	Fungi	Mucor	10 ⁷ -10 ⁸	500-5000
	Algae	Chlorella	10 ⁵ -10 ⁶	10-1500
	Protozoans	Euglena	10 ⁵ -10 ⁶	5-200
Sand 75-2000	Nematodes	Pratylenchus	10 ³ -10 ⁵	1-1000

4. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement

La pollution par hydrocarbures en milieu marin et terrestre pose d'importants problèmes d'élimination et les sols pollués par les hydrocarbures présentent un risque lors d'un contact direct avec l'homme ou l'animal ou lors de leur transfert dans la chaîne alimentaire, les contaminants organiques se retrouvent immobilisés au niveau des sols

(figure 4). Ce phénomène est dit géosorption, c'est un procédé d'accumulation de molécules sur des surfaces solides ou d'une phase du sol vers une autre.

Dans le cas des hydrocarbures, leur sorption se fait majoritairement sur les fractions organique et minérale du sol. Ce phénomène est gouverné par différents paramètres : les propriétés intrinsèques de l'écosystème, les facteurs environnementaux et les propriétés physico-chimiques du polluant (Militon, 2007).

D'une autre part ces hydrocarbures rejetés dans les océans s'étalent à la surface avant de subir une série de modifications parmi les altérations que peut subir un hydrocarbure, on citera les facteurs environnementaux tels que la sédimentation, la photo-oxydation, l'évaporation et l'émulsion cette dernière est définie comme étant l'incorporation de gouttelettes d'eau dans les hydrocarbures pétroliers, ce processus conduit à la formation des émulsions difficilement dégradables.

La biodégradation ou la dégradation microbienne présente le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement, en effet la dégradation d'un pétrole brut par des microorganismes est considéré comme le mécanisme le plus efficace pour l'élimination de ce polluant.

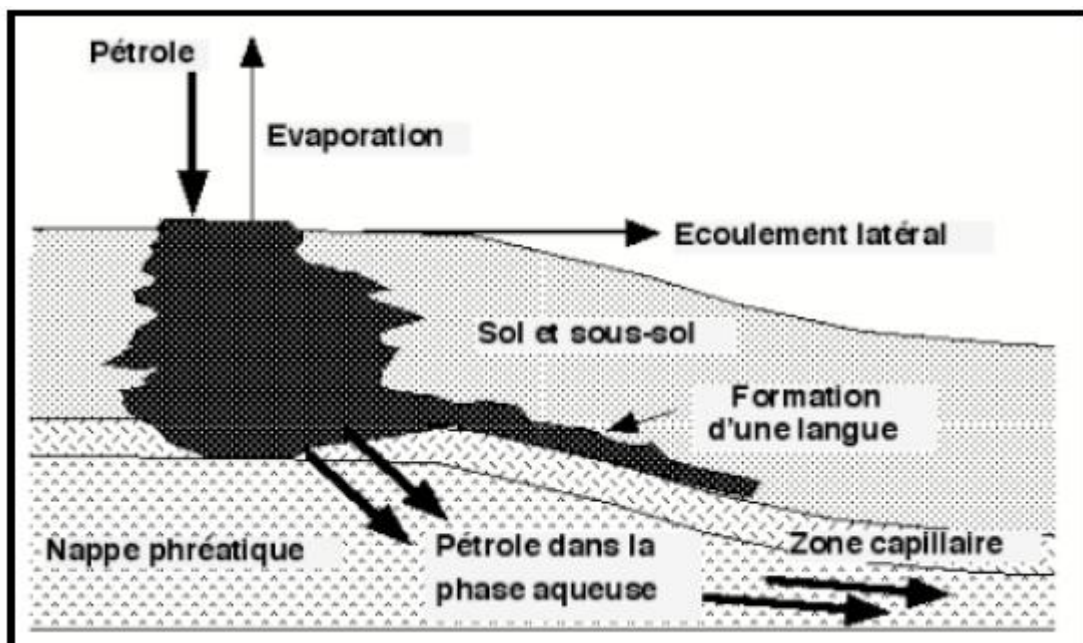


Figure 4: Illustration schématique du devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol. (Morgan et watkinsong.,1989).

Chapitre II : Les différentes techniques de réhabilitation des sols pollués

Les différents procédés de traitements des sols contaminés visent toutes à dégrader les agents polluants, diminuer leurs concentrations jusqu'à des seuils convenables selon les normes, ou à stabiliser les contaminants dans le sol.

Il existe de diverses méthodes de décontamination dont le choix s'avère difficile, il devrait être pondéré sur des bases environnementales, sanitaires et économiques pour assurer le succès de la dépollution

Plusieurs méthodes sont mise en œuvre à travers des traitements physiques, chimiques, thermiques et biologiques.

1. Méthode physique

Elle constitue la grande majorité des techniques utilisées. Leur principe consiste à utiliser des fluides présents ou injectés pour transporter la pollution vers un point de récupération ou stabilisation sans toutefois modifier ou détruire le polluant (Colombano *et al.*, 2010).

On y distingue deux grands types de méthodes : celle par piégeage et celle par évacuation.

2. Méthode chimique

Les traitements chimiques sont le plus souvent et spécialement utilisés pour dépolluer des eaux souterraines. Cependant, les sols (selon leur composition et leur taux d'humidité) peuvent aussi être traités par cette approche (Gan *et al.*, 2009).

L'objectif essentiel de ces traitements est de dégrader les polluants ou, simplement, de les modifier en une forme moins toxique pour l'environnement, où des réactions chimiques entre le polluant et le réactif seront établies (Colombano *et al.*, 2010).

3. Méthode thermique

Ce type de traitement vise à éliminer la majeure partie de la pollution. Techniquement, il consiste à chauffer le sol pollué à haute température afin de permettre la volatilisation, l'extraction ou la destruction complète des composés polluants (Louati, 2013).

4. Méthode biologique

Des solutions alternatives de décontamination des sols pollués ne cessent de voir le jour. Elles font appel, pour la plupart, aux capacités naturelles et régénératrices des plantes et des microorganismes.

La décontamination par voie biologique consiste donc à stimuler un phénomène naturel pour en augmenter le rendement afin de détruire ou de dégager le polluant organique, lequel sera utilisé comme source de carbone ou, seconde alternative, à diminuer sa concentration et le rendre moins toxique.

Pour ce faire, différentes approches innovantes sont employées:

4.1 La phytoremediation

Pratiquement, elle consiste à utiliser des plantes et des microorganismes associés afin d'extraire, de réduire, d'immobiliser ou de dégrader les polluants des écosystèmes pollués (Pilon-Smits, 2005).

De par leurs caractéristiques propres, certaines plantes sont répertoriées comme améliorants de la remédiation des sols (figure 5). De ces caractéristiques, l'on peut évoquer divers processus biochimiques et physiques, et en citer, comme exemple, la sécrétion de molécules comparables à des surfactants, lesquels ont un rôle pondérable dans l'augmentation de la biodisponibilité des polluants (Gan *et al.*, 2009).

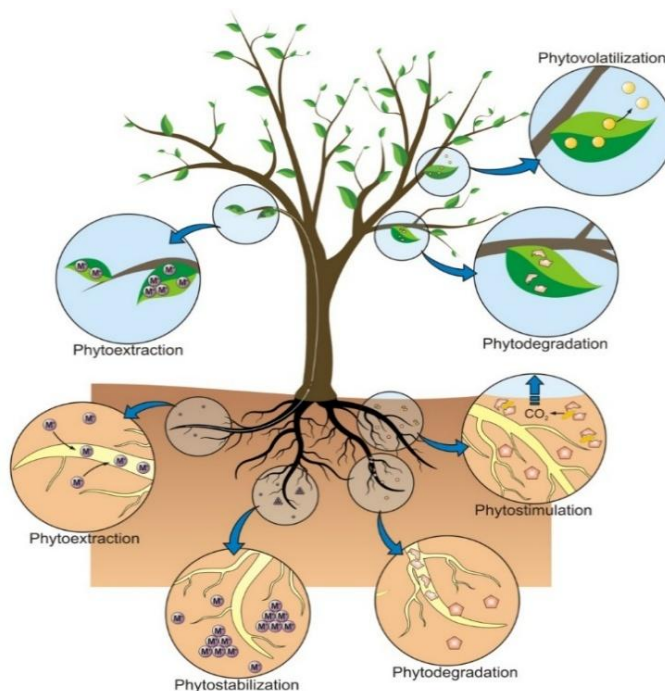


Figure 5 : Les différentes stratégies de phytoremediation (<https://www.intechopen.com/>)

4.2 La bioremediation

La bioremediation est un processus qui utilise le potentiel naturel dont disposent les microorganismes (bactéries, champignons, algues) à dégrader de nombreux composés

toxiques (Fokou Mbogne, 2017). Il importe de signaler que ces microorganismes peuvent être endogènes ou exogènes au terrain contaminé.

Elle se déroule et s'accomplit, généralement, en aérobiose. Par contre, son application en condition d'anaérobiose permet la dégradation de différentes molécules récalcitrantes ou résistantes (Mingjun *et al.*, 2007).

C'est une technique développée plus récemment et exige une approche multidisciplinaire au regard de la complexité des agents polluants et des milieux à traiter.

En effet, la bioremediation peut être réalisée *ex situ* où elle nécessite l'excavation des sols à traiter, ou *in situ* : là, elle requière la mise en place d'un système de traitement conséquent et dont voici les principaux types ou cas de figures :

4.2.1 L'atténuation naturelle

L'atténuation naturelle est un procédé basé sur les capacités épuratrices naturelles des microorganismes présents au niveau des milieux pollués.

Malgré le fait que, théoriquement, cette technique de décontamination ne fait pas appel à l'intervention humaine, il est recommandable d'éliminer ou, du moins, neutraliser la source de pollution et de surveiller le site jusqu'à la fin du traitement (Mulligan *et al.*, 2004).

4.2.2 La bioaugmentation

Il se trouve que, dans certains cas, les populations microbiennes endogènes d'un écosystème pollué ne présentent pas tous les outils métaboliques permettant de réaliser une dégradation complète des polluants. La bioaugmentation permet de remédier à ce manque (El Fantroussi et Agathos, 2005).

Ainsi, la bioaugmentation consiste en une opération d'ajout de microorganismes étrangers actifs (naturels doués de métabolismes adaptés ou génétiquement modifiés) ou des enzymes spécifiques adaptées pour dégrader des polluants précis.

Les microorganismes sont méthodiquement sélectionnés sur la base de : premièrement, leur capacité métabolique à transformer les hydrocarbures en produits de dégradation moins toxique ; deuxièmement, leurs caractéristiques essentielles qui permettent aux cellules d'être actives et persistantes dans les conditions environnementales souhaitées.

4.2.3 Facteurs influençant la bioremediation

De nombreux facteurs peuvent avoir un effet notable sur la bioremediation : la nature, la concentration et le volume des produits à traiter influencent car les bactéries sont efficaces à des concentrations relativement faibles de polluant.

Il y a également les difficultés d'adaptation des souches bactériennes in-situ: il va sans dire que les réalités au laboratoire sont différentes des réalités sur le terrain. Le fait que le polluant soit dispersé de façon hétérogène sur le site représente un facteur majeur. Le biotope peut subir des modifications pendant le changement de saison ce qui peut ralentir ou stopper l'activité microbienne.

Enfin, il est important de vérifier que l'activité microbienne ne dégage pas des composés plus toxiques pouvant être nuisibles aux êtres vivants. (Alexandre, 1994)

5. Nouvelles méthodes

5.1 électrocinétique-bioremediation

Récemment, de nombreuses autres approches ont été adoptées pour améliorer la bioremediation dont l'électrocinétique-bioremediation (Ek-Bio) qui constitue une des techniques novatrices pouvant être utilisées pour traiter un sol contaminé (figure6).

Cette technologie émergente repose sur l'application d'un champ électrique continu de faible densité dans le sol contaminé pour séparer et extraire les métaux lourds, les radionucléides et les contaminants organiques (Nur, 2018).

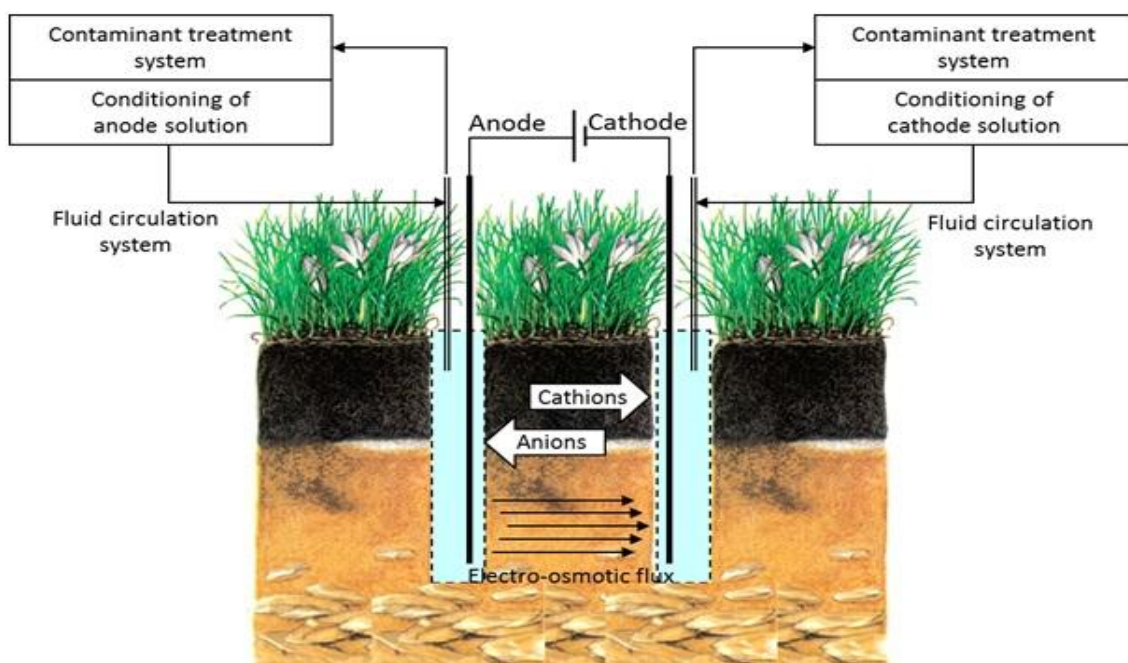


Figure 6: Le principe de l'électrocinétique-bioremediation (Cameselle *et al.*, 2013).

5.2 L'application du Génie Génétique

Les progrès et l'innovation d'analyse de biologie moléculaire facilite la détection de la communauté microbienne adaptée à la bioremediation.

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) a mis la métagénomique et la métatranscriptomique à la portée des chercheurs.

Cette combinaison a permis de mieux comprendre les communautés microbiennes et le mécanisme de bioremediation des environnements pollués.

Ces techniques sont capables d'améliorer le traitement biologique en permettant une caractérisation très sensible de microorganisme précédemment non cultivés et permet la découverte de nouveaux microorganismes utiliser dans la bioaugmentation (Czaplicki et Gnuosh, 2016).

6. Avantages et inconvénients de la bioremediation

La bioremediation des sols contaminés constitue une préoccupation active, elle présente toutefois des avantages encourageants. Cependant, la bioremediation se heurte à des difficultés techniques multiples. Le tableau 3 présente les principaux avantages et inconvénients de cette approche.

Tableau 3 : les avantages et les inconvénients de la bioremediation (Roger et Jacq, 2000).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none">• Processus naturel utilise la capacité épuratrice des microorganismes	<ul style="list-style-type: none">• Limité seulement aux composés biodégradables
<ul style="list-style-type: none">• Elle perturbe généralement moins le biotope que les méthodes physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none">• nécessite une condition de croissance environnementale appropriée
<ul style="list-style-type: none">• utile pour la destruction complète d'une grande variété de contaminants	<ul style="list-style-type: none">• les produits de la biodégradation peuvent être plus toxiques et persistants que les composés d'origine
<ul style="list-style-type: none">• Moins cher que les autres techniques	<ul style="list-style-type: none">• Dans certain cas elle prend beaucoup de temps

Chapitre III : La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes

1. La biodégradation

La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes est indéniablement le processus le plus abouti dans l'élimination des polluants d'origine pétrolière (figure 7). Même s'il est relativement lent, ce phénomène permet une dégradation quasi-complète (transformation en CO_2) des hydrocarbures (Sauret, 2011).

Elle est considérée comme le processus principal d'élimination de ces contaminants (Haritash et Kaushik, 2009).

Un grand nombre des bactéries, champignons et algues ont la capacité de dégrader les hydrocarbures soit par des souches pures, soit par un consortium microbien (Hentati, 2018).

L'efficacité rapportée de la biodégradation variait de 6% (Jones *et al.*, 1970) à 82% (Pinholt *et al.*, 1979) pour les champignons du sol, 0,13% (Jones *et al.*, 1970) à 50% (Pinholt *et al.*, 1979) pour les bactéries du sol et de 0,003% (Hollaway *et al.*, 1980) à 100% (Phillips et Stewart, 1974) pour les bactéries marines.

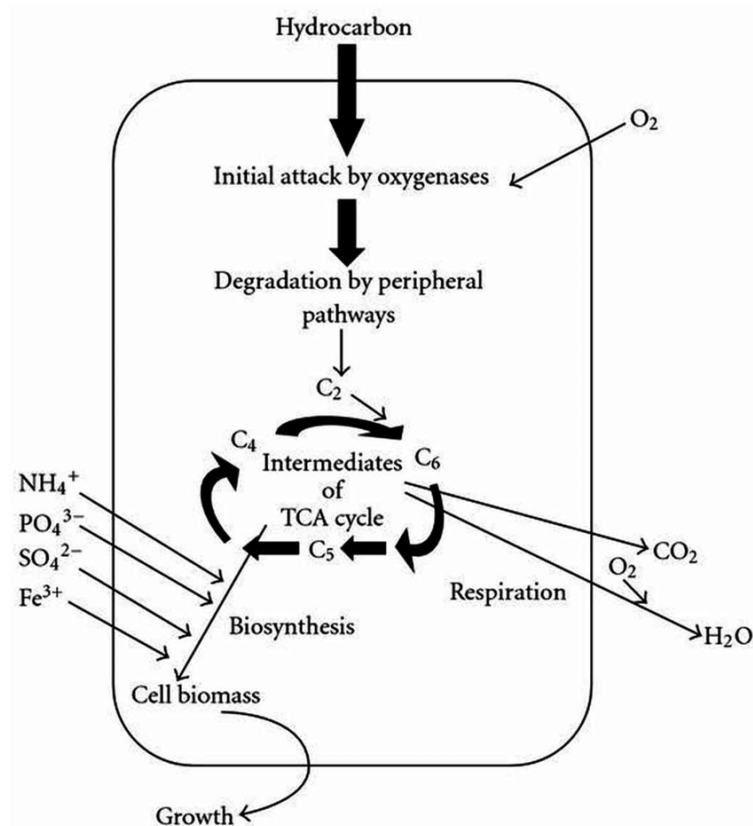


Figure 7 : Mécanisme général de biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes (Das et Chandran, 2009).

1.1 Les microorganismes impliqués dans la biodégradation

1.2 Les bactéries

Les bactéries sont les microorganismes souvent impliqués dans la dégradation des hydrocarbures des sites contaminés, et agissent en tant que principaux agents de dégradation des hydrocarbures déversés dans l'environnement.

Cela fait tout juste un siècle que des bactéries capables d'utiliser des produits pétroliers comme seule source d'énergie et de carbone ont été isolées pour la première fois, ce sont les bactéries hydrocarbonoclastes (figure 8).

Le niveau de dégradation des pétroles (mélange de composés facilement dégradables et de composés récalcitrants) est donc totalement dépendant de la diversité métabolique des bactéries hydrocarbonoclastes présentes dans l'environnement pollué (Sauret, 2011).

De nombreux genres bactériens ont été recensés et décrits comme aptes à dégrader des hydrocarbures:

Aeromonas, Acetobacter, Achromobacter, Acinetobacter, Actinomyces, Alcaligenes, Alcanivorax, Bacillus, Beneckea, Brevibacterium, Burkholderia, Corynebacterium, Cycloclasticus, Cytophaga, Erwinia, Flavobacterium, Klebsiella, Lactobacillus, Leucothrix, Micrococcus, Moraxella, Mycobacterium, Myxobacterium, Nocardia, Peptococcus, Pseudomonas, Rhodococcus, Sarcina, Serratia, Shewanella, Spherotilus, Xanthomonas (Morlett-Chávez *et al.*, 2010 ; Tarayre, 2012).

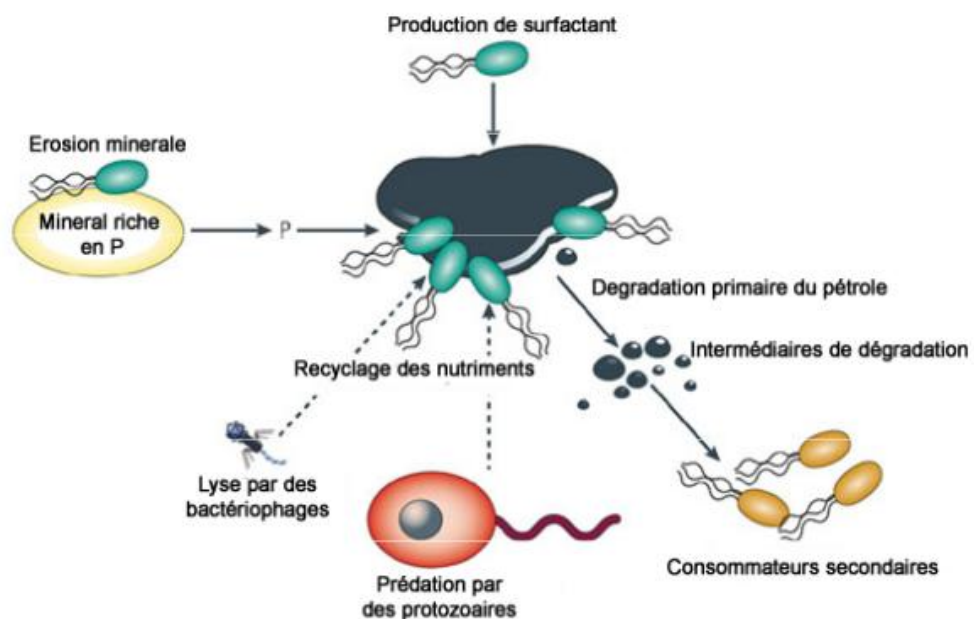


Figure 8 : Réseau de dégradation du pétrole par la bactérie (Head *et al.*, 2006)

1.2.1 La biodégradation par le genre *Pseudomonas*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif ubiquitaire, présente dans le sol et dans les milieux aquatiques, non sporulante de forme droite ou légèrement courbée. Elle mesure de 1 à 5 µm de long et de 0,5 à 1 µm de large. Cette bactérie est saprophyte qui peut devenir un pathogène opportuniste, Elle se distingue par sa grande adaptabilité aux différentes situations environnementales par la multiplicité de ses facteurs de virulence

P. aeruginosa est une bactérie mobile grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire. Sa morphologie est facilement distinctive grâce à la production de la pyocyanine (un pigment bleu-vert diffusible dans le milieu extracellulaire) d'où le nom de bacille pyocyanique.

Les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne dans le sol. Principalement, Elles participent à la biodégradation des hydrocarbures lorsqu'ils sont biodisponibles dans l'environnement dont elles utilisent des voies métaboliques très variées pour utiliser ces polluants comme source de carbone et d'énergie.

Des *Pseudomonas*, appartenant à la classe des Gammaprotéobactéria, ont servi de modèles pour étudier le métabolisme du naphthalène et du phénanthrène.

De même, *Pseudomonas aeruginosa* a été isolée pour ses capacités à dégrader le phénanthrène (Romero *et al.*, 1998). Donc, le genre *Pseudomonas* était le principal acteur de cette dégradation, il est le plus connu pour être utilisé dans la biodégradation des hydrocarbures à cause de sa production de biosurfactants, qui vont solubiliser les hydrocarbures hydrophobes adsorbés sur les particules des sols et les rendant, par conséquent, plus disponibles pour les autres bactéries et faciliter, par la suite, leur dégradation (Benchouk, 2017).

Tableau 4 : La taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa*

Règne	Bacteria
Embranchement	Prokaryota
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	Pseudomonadaceae
Genre	<i>Pseudomonas</i>

1.2.2 La biodégradation par l'espèce *Serratia marcescens*

S. marcescens est un bacille à Gram négatif qui mesure 0.5-0.8 µm de diamètre et de 0.9-2 µm de longueur (Holt, 1994) mobile par ciliature péritriche, asporulée (Lefrere, 2000) et capsulée mais certaines études ont montré que la capsule peut être formée quand les souches sont cultivées en aérobiose sur un milieu de culture qui contient de faibles quantité de nitrogène et de phosphate (Embrey, 2004). Certaines souches de *S. marcescens* produisent un pigment non diffusible d'une couleur rose à rouge vif appelé la prodigiosine : C'est un métabolite secondaire alcaloïde appartenant à la famille de pigments rouges naturels qui partagent une caractéristique commune des trois cycles pyrrole dans leur structure chimique (Giri, 2004).

L'intensité de la couleur dépend de l'âge des colonies (Hejazi et Falkiner, 1997).

La *S.marcescens* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, les espèces du genre *Serratia* sont généralement isolées des plantes (légumes, champignons, mousses), du tube digestif des rongeurs, des insectes, de l'eau et du sol. Cette bactérie est rarement pathogène, sa taxonomie est présentée dans le tableau 5 :

Tableau 5 : La taxonomie de *Serratia marcescens*.

Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	Gamma proteobacteria
Ordre	Enterobacteriales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	<i>Serratia</i>

Plusieurs travaux de recherche sur cette espèce ont rapporté sa capacité à dégrader les hydrocarbures pétroliers. En effet, selon Wongs P. et ses collaborateurs (2004), cette bactérie a montré une grande capacité et un large spectre de dégradation des hydrocarbures dans l'essence, le kérosène, le diesel et l'huile de lubrification.

Aussi, le mécanisme de dégradation du diesel par *Serratia marcescens* a été élucidé dans un pipeline de transport de pétrole dans le nord-ouest de l'Inde par les travaux d' Aruliah, R. et ses collaborateurs (2007).

1.2.3 Mode d'accès aux hydrocarbures par la cellule bactérienne

Depuis une décennie, la faible décomposition des polluants a été attribuée à leur récalcitrance. Mais récemment il a été avéré que c'est plutôt leur très faible hydro-solubilité qui rend leur catabolisme plus difficile.

De ce fait, les bactéries développent des stratégies pour utiliser ces composés. Quatre modes d'accès ont été décrits pour expliquer le mécanisme d'assimilation des hydrocarbures par les microorganismes (figure 9).

- **Utilisation de la phase dissoute**

Une fois le composé dissout et assimilé, la cellule bactérienne ne peut utiliser que les substrats sous forme solubilisée. Ce mode est généralement rapporté pour les alcanes légers et certains HAP suffisamment solubles.

- **L'accès interfacial**

La membrane cellulaire des microorganismes s'associe aux gouttelettes des hydrocarbures présents dans le milieu du fait de son hydrophobicité élevée. En revanche, le mécanisme de diffusion ou transport actif permet au substrat d'entrer directement dans la cellule sans se dissoudre dans la phase aqueuse (dans ce cas la bactérie ne produit pas de biosurfactants) (Vandecasteele et Ballerini, 1999) (Ducker, 1996).

- **L'accès interfacial facilité ou émulsification**

Des biosurfactants produits par des microorganismes accélèrent le transfert de l'hydrocarbure dans la cellule après contact direct substrat-cellule. Ce transfert facilité est dû à une augmentation de l'aire interfaciale entre la phase hydrophobe et la phase hydrophile (Perfumo *et al.*, 2010).

- **Le transfert micellaire**

Certains microorganismes ont la capacité de produire des biosurfactants qui solubiliseront des substrats dans des micelles qui à leur tour seraient directement assimilés (Comeau, 1999).

Les espèces les plus importants sont celles appartenant au genre *Pseudomonas* produisant les rhamnolipides et les espèces de *Torulopsis* produisant les sophrolipides. (Bireche et Berregui, 2014).

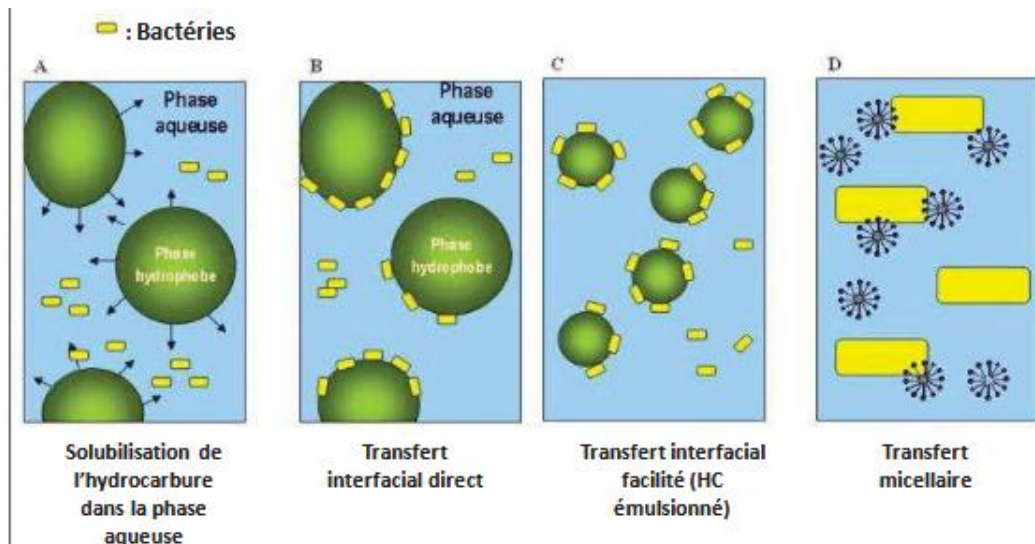


Figure 9 : Mécanisme d'accès des microorganismes aux hydrocarbures (Vandecasteele, 2005).

1.2.4 Adaptation génétiques des bactéries

Les bactéries dans leur environnement sont exposées à des signaux physico-chimiques les renseignant sur la biodisponibilité des polluants donc de nouvelles sources de carbone et d'énergie. Elles doivent intégrer ces signaux pour fournir rapidement la réponse métabolique la mieux adaptée au maintien. En effet, grâce aux mutations ponctuelles, aux réarrangements endogènes et aux transferts horizontaux, elles peuvent s'adapter à la présence des agents polluants en développant un processus enzymatique permettant de dégrader et/ou d'utiliser ce polluant pour leur survie et leur développement.

1.3 Champignons

La capacité de se développer sur les hydrocarbures ne se limite pas uniquement aux bactéries, certains sites contaminés contiennent également de nombreux champignons et levures capables de les dégrader (Yamada-Onodera *et al.*, 2002).

Les champignons sont connus par leur capacité de coloniser un large éventail d'environnements hétérogènes, leur capacité à s'adapter aux matrices de sol complexes, et même si à des conditions environnementales extrêmes.

Cependant, ils présentent des caractéristiques particulières qui les rendent plus utiles pour la bioremediation des sols pollués.

Parmi ces champignons les genres: *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Graphium*, *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Pencillium*, *Cunninghamell*, *Fusarium*, *Mucor*, *Phanerochaete*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* et *Trichoderma* (Young et Cerniglia, 1995) (Chaillan *et al.*, 2004) (Singh, 2006).

1.4 L'activité enzymatique impliquée dans la biodégradation

Les microorganismes sont considérés comme les agents biologiques les plus efficaces de la bioremediation des sols contaminés, Leur grand nombre d'enzymes les permet de dégrader une grande variété de substances polluantes (figure 10).

Selon Karigar et Rao (2011) Les enzymes impliquées dans la bioremediation sont les types suivants: oxydoréductases, laccases, peroxydases, enzymes hydrolytiques et cellulases. Les oxydoréductases comprennent les oxygénases, les désoxygénases et les monooxygénases

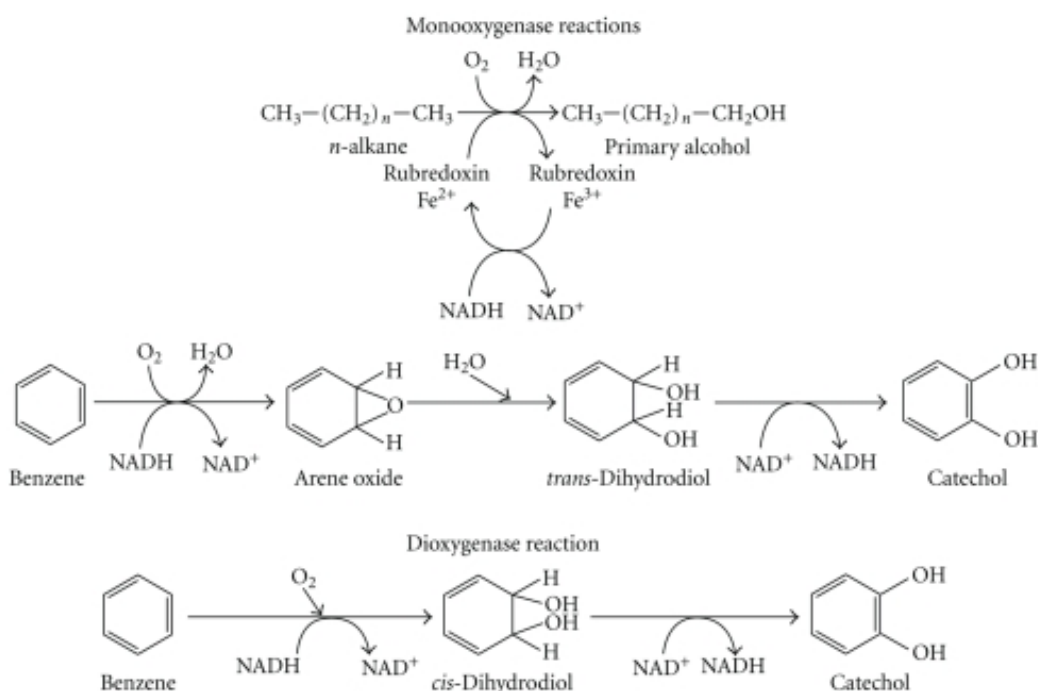


Figure 10 : Les réactions enzymatiques impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures. (Das et Chandran, 2009).

2. La voie métabolique de dégradation des hydrocarbures pétroliers

2.1 La biodégradation aérobie

Plusieurs microorganismes sont connus pour dégrader les hydrocarbures pétroliers en condition aérobie en développant des stratégies enzymatiques qui leur permettent d'incorporer un ou deux atomes d'oxygènes à la molécule ciblée. Cette réaction d'oxydation rend l'hydrocarbure plus hydrophile et par conséquent plus facilement dégradable par le métabolisme bactérien (Benchouk, 2017).

2.1.1 Minéralisation

Les enzymes jouent un rôle catalytique dans ce processus, où un produit chimique est converti par étapes en produits finis par le biais de divers intermédiaires. Cette transformation s'appelle la minéralisation. Les principaux produits finaux de cette voie sont la biomasse et le dioxyde de carbone (Maneerat et Kulnaree, 2007).

2.1.2 Co-métabolisme

Il peut être défini comme une réaction enzymatique non spécifique (Mohan *et al.*, 2006). Il correspond à la dégradation biologique d'un composé, par une enzyme produite de manière fortuite.

Cette enzyme catalyse normalement un autre substrat, mais elle peut présenter une certaine non-spécificité de substrat. Par principe, le phénomène de co-métabolisme ne bénéficie pas aux microorganismes produisant l'enzyme.

2.2 La biodégradation anaérobie

L'absence de l'oxygène moléculaire dans les environnements anoxiques implique une nouvelle stratégie d'activation enzymatique spécifique pour convertir les hydrocarbures apolaires en des composés contenant un groupement polaire (Heider *et al.*, 1999). Cette activation se traduit par l'introduction d'un ou plusieurs groupements hydroxyles dans la molécule apolaire.

PARTIE 02 :

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 01

MATERIEL
&
METHODES

Notre travail a pour objectif de réhabiliter deux sols contaminés l'un par le pétrole brut et l'autre par le kérosène en faisant appel à des souches bactériennes aptes à dégrader les hydrocarbures pétroliers.

1. Le sol

1.1 Les sites d'échantillonnage

Au cours de cette étude, l'échantillonnage a été effectué au mois d'avril 2019 à partir de deux régions différentes.

Le premier échantillon provient d'un sol forestier, il a été prélevé depuis la forêt de Chaabet Erssas, à l'université de Constantine1 (figure11). Le deuxième est d'un sol sableux prélevé à partir d'une plage à Annaba, Plus précisément Ain Achir (figure 12).

1.2 Méthode d'échantillonnage

Il s'agit d'une étape fondamentale et délicate, si les échantillons ne sont pas correctement prélevés et manipulés ou ne sont pas représentatifs d'un lot, les résultats n'auront aucune signification.

Au total, trois échantillons ont été utilisés à partir de chaque région. La distance moyenne entre les points de prélèvement est de 5 à 15 mètres pour que l'échantillonnage soit plus représentatif du site.

Les prélèvements sont réalisés aseptiquement afin de préserver la flore tellurique des deux sols. A l'aide d'une pioche désinfectée à l'éthanol et flambée, les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont décapés et les échantillons sont prélevés à partir de 10 à 15 cm de profondeur, puis ils sont acheminés vers la serre.

1.3 Préparation du sol

Après la réception des échantillons prélevés sur site, préalablement séchés dans une serre pendant 24 heures à une température ambiante, nous avons tout d'abord éliminé les matériaux grossiers puis procédé à un broyage manuel à l'aide d'un mortier et pilon.

En parallèle, l'étape de tamisage est effectuée à travers un tamis dont le diamètre des pores est de 2 mm pour que les particules de sol soit à grain unique (figure 13).



Figure 11 : Photographie du premier site de prélèvement (Université des frères Mentouri).

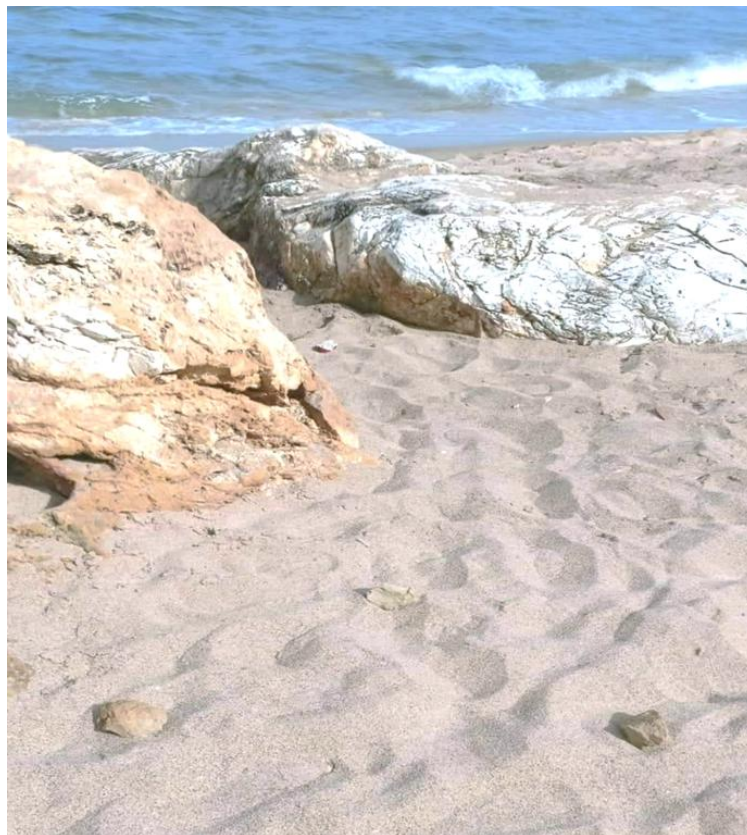


Figure 12 : Photographie du deuxième site du prélèvement (Plage d'Ain Achir).

Le sol a été pesé et mis dans des sachets en plastique, ensuite, les sachets ont été répartis dans des bacs dont chacun contient 2 kg de sol en mettant 1 kg de chaque type (1kg de sol + 1 kg de sable).



Figure 13 : Les étapes de préparation des deux échantillons du sol (broyage et tamisage).

2. Les polluants

Les hydrocarbures pétroliers désignent un mélange de composés organiques dont plusieurs microorganismes peuvent utiliser comme une source de carbone et d'énergie.

Dans notre travail, les polluants utilisés pour contaminer artificiellement le sol sont le pétrole et le kérosène, dont le premier polluant provient du service d'exploitation Sonatrach ainsi le deuxième provient du laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire

2.1 La préparation des polluants

La filtration stérilisante est une technique qui consiste à faire passer un liquide à travers un filtre qui va retenir les bactéries.

Aseptiquement, la filtration de ces deux composés a été faite à travers un filtre stérile dont le diamètre des pores est de $0.22\mu\text{m}$ afin de retenir les plus petits microorganismes présents (figure 14).



Figure 14 : Filtration du polluant.

3. Les souches bactériennes utilisées

Les souches bactériennes utilisées dans ce travail sont issues d'une étude antérieure de madame Guergouri (non publié). Elles ont été isolées de sites contaminés par les hydrocarbures pétroliers. Ces souches ont fait l'objet de tests de dégradation de pétrole brute sur gélose et de détection de production de biosurfactants ainsi que d'autres tests prouvant leur pouvoir.

Les souches bactériennes utilisées ont été isolées sur gélose nutritive préalablement préparée et autoclavée dans des flacons, et répartie par la suite dans des boites de pétri.

A l'aide d'une anse de platine stérile, un échantillon de chaque souche a été ensemencé dans les boites par la méthode des stries serrés, puis incubées pendant 24 h à 30 ° C pour permettre le développement des colonies.

3.1 Caractérisation macroscopique et microscopique

La caractérisation est réalisée en se basant sur l'étude morphologique.

3.1.1 Aspect macroscopique

Après incubation, les colonies bactériennes ont été développées sur le milieu gélosé. Le premier critère d'identification sur lequel on se base est celui de l'aspect macroscopique des colonies vues à l'œil nu.

Les caractères cultureux qui déterminent l'aspect macroscopique des colonies sont :

- la forme des colonies : ronde, irrégulière, etc.
- la taille des colonies : par la mesure de diamètre.
- la chromogénèse : couleur de la colonie.
- l'élévation : convexe, concave, plate.
- l'opacité : opaque, translucide ou transparente.
- la surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée, etc.

3.1.2 L'aspect microscopique

L'examen microscopique des bactéries permet d'observer leur morphologie ainsi que leur mobilité. Ces caractéristiques sont observées directement au microscope.

Coloration de Gram (Annexe 2)

C'est une coloration différentielle découverte par Hans Gram. Selon cette méthode de coloration, les bactéries peuvent être divisées en deux groupes distincts : les bactéries Gram- prennent la couleur rose, alors que les bactéries Gram + apparaissent en violet.

Cette coloration a été réalisée sur les 3 souches pour déterminer la forme des cellules, leur mode de regroupement et pour vérifier également la pureté des souches.

Cette technique représente un critère systématique important pour la classification des bactéries.

Dans le cadre de cette étude nous avons utilisé un consortium bactérien composé de trois bactéries, il s'agit de M6 c'est une *Serratia marcescens*, et deux souches de I2 et H9 ce sont des *Pseudomonas aeruginosa*.

Ces bactéries sont connues et sélectionnées pour leur performance à dégrader les hydrocarbures.

3.2 Préparation de l'inoculum

Un inoculum est un échantillonnage de micro-organismes ensemencés dans un milieu de culture, il est défini par son volume et sa teneur en germe. Dans le cadre de la bioaugmentation, l'inoculation vise à augmenter la microflore indigène et exogène du sol ayant l'aptitude à dégrader les polluants

Dans notre expérimentation, l'inoculum a été préparé à partir de colonies viables (des trois souches), fraîchement identifiées dans un tube à essai contenant un bouillon nutritif. Après homogénéisation du bouillon, une étape de standardisation est nécessaire

La densité optique de la suspension bactérienne est mesurée à 600nm, puis standardisée à 0.1, ce qui correspond à la charge initiale des bactéries qui vont être injectées dans le sol à environ 10^7 à 10^8 UFC/ml.

4. La bioremediation des sols pollués par le pétrole et le kérosène

La contamination des sols par les hydrocarbures pétroliers représente une menace apparue progressivement. Il est donc primordial de mettre en œuvre des techniques de bioremediation afin de décontaminer ces sols.

Dans le cadre de cette expérience la bioremediation se base sur un procédé de bioaugmentation. 5 boîtes en plastique de dimensions (32x21x13.5 cm) sont préparées chaque boîte contient 2 kg de sol (1kg sol+ 1kg sable).

Les échantillons de sols ont été volontairement pollués avec une quantité de 100ml pétrole brut et 100ml de kérosène séparément. Cette approche se réfère aux travaux de Hawrot et Nowak (2005).

Les méthodes de bioremediation appliquées sont présentées dans le tableau 6 et la figure 16.

5. Le suivi de la bioremediation des sols pollués

Cette étape est consacrée à l'étude de l'effet du pétrole et du kérosène sur l'activité biologique, plus précisément sur la biomasse microbienne ainsi que sur le taux de germination des grains.

Le suivi est effectué durant 45 jours d'expérimentation.

Tableau 6 : Les méthodes de bioremediation appliquées.

Les Boites	Abr	Les contenus
Témoin	T	2 Kg de sol
Atténuation naturelle pétrole	ATT P	2Kg de sol +100 ml Pétrole
Biougmentation pétrole	BIO P	2 Kg de sol +100 ml pétrole+40 ml du consortium bactérien (I2, H9, M6)
Atténuation naturelle kérosène	ATT K	2kg de sol +100 ml kérosène
Bioaugmentation kérosène	BIO K	2 kg de sol +100 ml kérosène+ 40ml du consortium bactérien (I2, H9, M6)



Figure 15 : Le dispositif expérimental (**a** : les polluant + la suspension bactérien ; **b** : pollution du sol par le pétrole ; **c** : pollution du sol par le kérosène ; **d** : les bacs traités).

5.1 Irrigation et retournement

L'humidité des bacs est maintenue par l'apport d'une quantité d'eau distillée stérile (20 ml). Ces échantillons sont également aérés en mélangeant à l'aide d'une spatule stérile, désinfectée et flambée préalablement. Cette opération est effectuée hebdomadairement durant les 45 jours de l'expérimentation (figure 17).

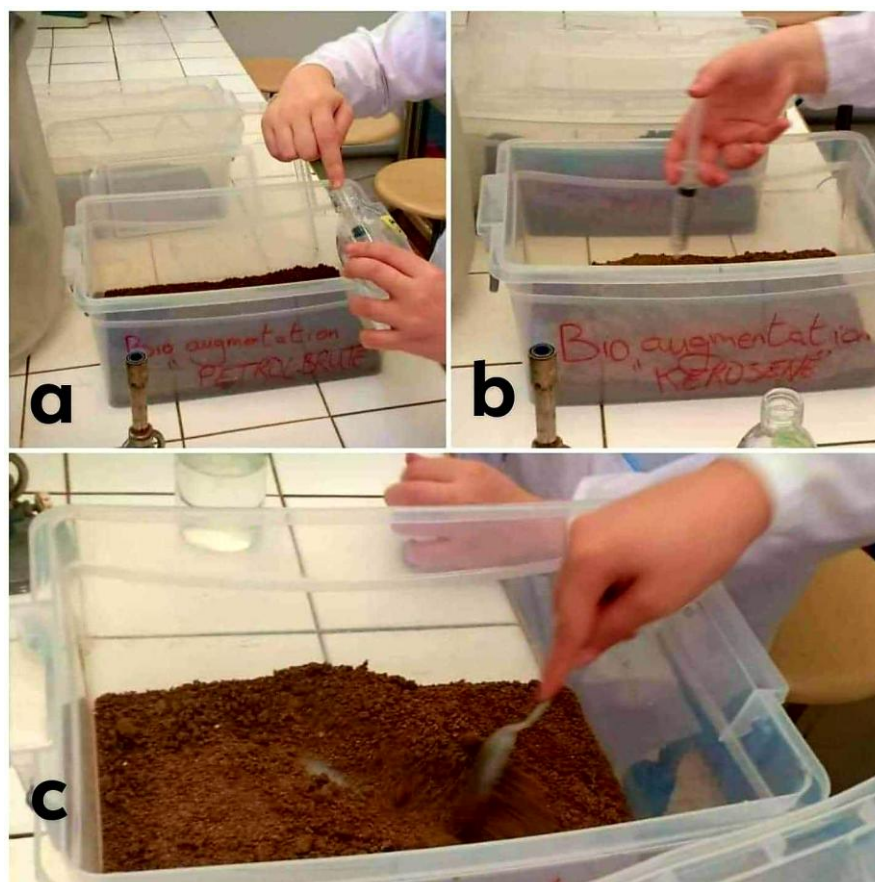


Figure 16 : a et b : Irrigation des sol ; c : Retournement des sols.

5.2 Suivi de la biomasse bactérienne

- **Dénombrement**

Les techniques de dénombrement ont pour but de déterminer la concentration en cellules bactériennes contenue dans une préparation initiale. Dans notre travail, ces approches nous permettent d'estimer approximativement le taux de dégradation des hydrocarbures pétroliers et la prolifération des souches bactériennes performantes injectées dans le sol contaminé par les polluants.

- **Préparation des dilutions**

A partir d'une suspension mère (1g de sol dissout dans 9 ml d'eau physiologique), une série de dilution décimale variant de 10^{-1} à 10^6 a été réalisée. 1ml de la suspension mère a été prélevé aseptiquement et versé dans 9 ml d'eau physiologique stérile ; la suspension ainsi obtenue correspond à la dilution 10^{-1} . Cette dernière est agitée pendant quelques secondes avant de prélever 1 ml que l'on ajoute à 9 ml d'eau physiologique stérile donnant ainsi la dilution 10^{-2} . Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriées.

- **Ensemencement**

La méthode utilisée est celle de l'ensemencement en surface par étalement d'un volume de la des dilutions plutôt préparée sur un milieu solide. Après agitation des tubes, 100 μ l de chaque dilution est déposé dans une boîte contenant le milieu de culture stérile, puis ensemencée selon la technique et étalée par un râteau. Les boîtes ensemencées sont incubées à 30 °C pendant 24 h.

5.3 Evaluation de la charge microbienne

Nous avons adopté le dénombrement sur milieu solide (en surface). C'est une méthode qui s'appuie sur le fait qu'un micro-organisme présent dans un produit ou dans une suspension, mis en culture dans des conditions optimales, en milieu solide convenable, s'y développe en formant une colonie.

La détermination de la charge microbienne est faite par comptage des colonies et les résultats sont exprimés en UFC (nombre d'Unités Formant Colonies) / ml d'eau, selon la formule mathématique ci-dessous. Seules les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies sont retenues pour le dénombrement.

Selon Marchal *et al.*, (1982) le nombre de germe par gramme de sol est déterminé en calculant la moyenne arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte des facteurs de dilution.

$$N = \sum c / d \cdot v$$

N : nombre des microorganismes en UFC /ml.

ΣC : nombre d'unité formant colonie.

v : Volumeensemencé (0,1ml).

d : Taux de dilution.

Le dénombrement est effectué à T₀, T₁₅, T₃₀ et T₄₅.

6. Test de germination :

Parallèlement au test microbiologique, un protocole visant à examiner l'effet de la contamination par les hydrocarbures sur la germination des graines a été réalisé.

En effet, c'est un test qui permet de mettre en œuvre l'efficacité et l'importance de la bioremediation ainsi que le taux de germination des graines d'orge en présence des polluants.

Le test de germination permet de déterminer l'effet toxique des polluants et leur impact sur la demi-vie d'une graine. Ce choix s'est porté sur ce végétal en raison de sa bonne faculté germinative et sa sensibilité à la pollution

Ce test est effectué chaque quinzaine pendant 45 jours.

Des graines d'orge, saines et sélectionnées selon leurs tailles et formes, sont désinfectées pendant 5 minutes à l'eau javelisé puis rincées plusieurs fois à l'eau distillé.

A T₀, les graines d'orge ont été semées dans des boites en plastique (17x11x6 cm) à raison de 12 graines dans chaque boite (figure 18). Le procédé a été suivi durant sept jours avec une irrigation régulière chaque deux jour.

6.1 La longueur des parties aériennes et racinaires

Après 07 jours, les graines d'orge vont se développer et entrainer d'importantes modifications. Les plantes sont extraites en plaçant les boites dans de l'eau et les longueurs des parties racinaires et les parties aériennes sont mesurées.

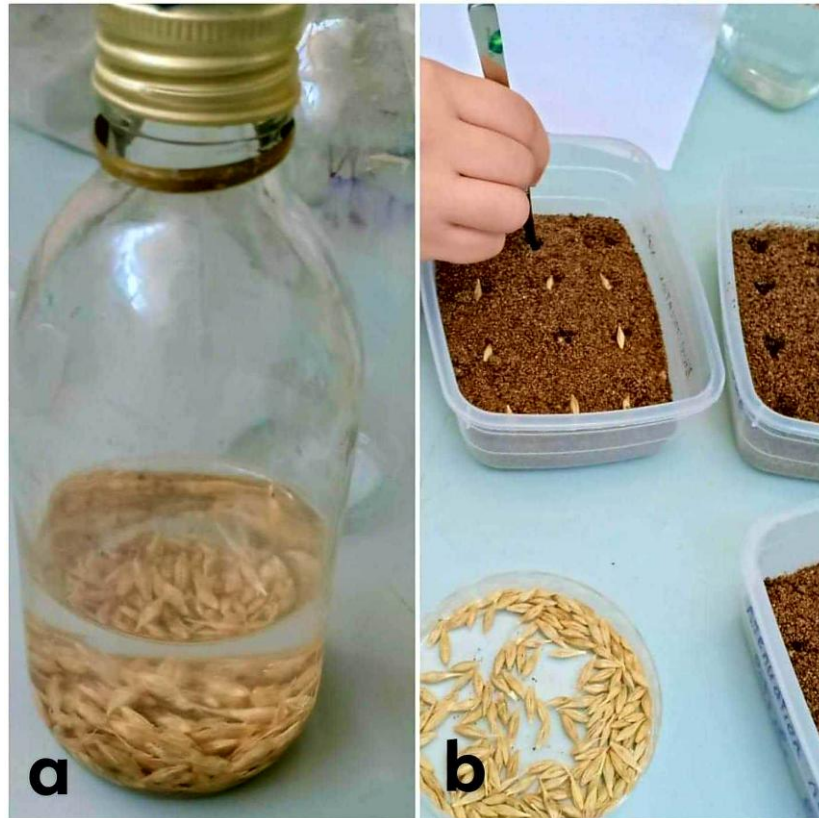


Figure 17 : a : Désinfection des grains d'orge ; b : Semence des grains d'orge.

6.2 L'indice de germination

L'indice de germination est un chiffre compris entre 0 et 1, indique la capacité de blé à germer dans un milieu donné. Le taux de germination des graines et la longueur des racines ont été combinés en un indice de germination (I_g) selon l'équation suivante (D'Annibale *et al.*, 2006) (Graj *et al.*, 2013) :

$$\text{Indice de germination } (I_g) = \frac{Ge \times Le}{Gt \times Lt} \times 100$$

Où :

Ge : est le nombre des graines germées dans l'échantillon .

Gt : est le nombre de graines germées dans le témoin.

Le : est la longueur des racines dans l'échantillon.

Lt : est la longueur des racines dans le témoin.

Chapitre 02 :

**RESULTATS
&
DISCUSSION**

1. Caractérisation des souches dégradant les hydrocarbures

1.1 Aspect macroscopique

La description macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation. Le repiquage des trois souches sur Gélose, nous a permis d'étudier l'aspect des colonies développées (figure 18), les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 7 : L'aspect macroscopique des colonies isolées sur gélose nutritive.

Souches	I2	M6	H8
Chromogènes	Bleu vert	Rouge	Bleu vert
Forme	Irrégulière	Ronde	Irrégulière
Élévation	Elevée	Bombée	Elevée
Opacité	Translucide	Transparente	Translucide
Surface	Lisse	Rugueuse	Lisse
Contour	Dentelé	Régulier	Dentelé
Consistance	Crémeuse	Crémeuse	Crémeuse

1.2 Aspect microscopique

L'observation microscopique des trois souches a été réalisée suivant la coloration de Gram où nous a permis de caractériser la forme des cellules, leur taille, ainsi que leur mode de regroupement (figure 19). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 8

Tableau 8 : Les différents aspects microscopiques des souches bactériennes.

Souches	Gram	Forme	Arrangement
I2	–	Coccobacille	Diplocoque
M6	–	Bacille	Isolées/ Diplobacilles
H8	–	Coccobacille	Isolées/ Diplobacilles

D'après nos résultats (tableau 8), il ressort que les bactéries isolées présentent deux différentes formes : bacille, et coccobacille et qu'elles sont individuelles, et parfois regroupées par paires

La coloration de Gram a révélé que les souches isolées appartiennent toutes au groupe des bactéries Gram négatif en prenant la couleur rose.

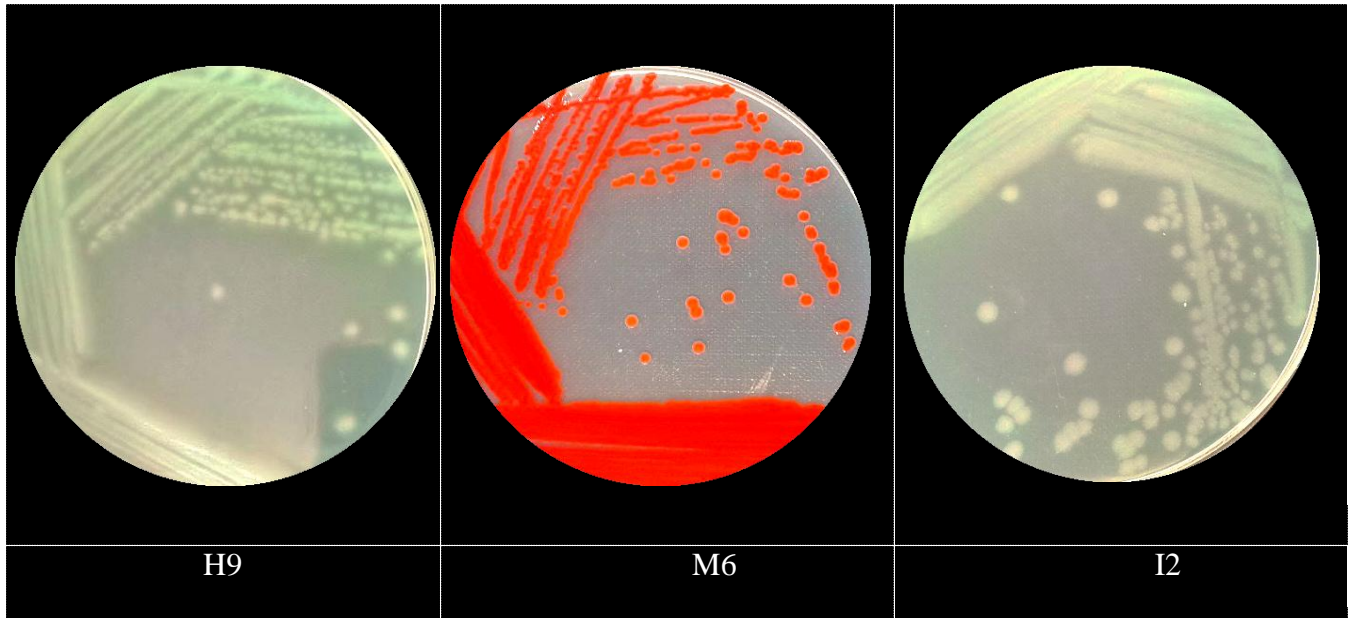


Figure 18 : Photographies de l'aspect macroscopique des souches bactériennes.

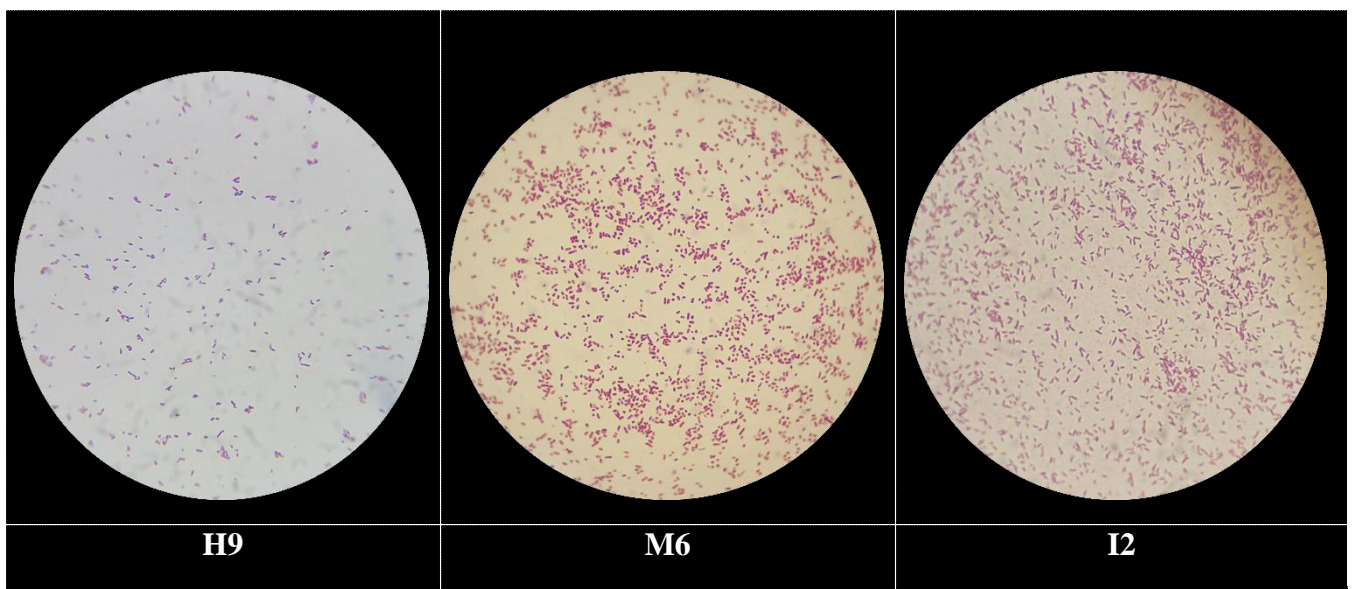


Figure 19 : Photographies de l'aspect microscopique objectif 100 des souches bactériennes.

2. Le suivi de la bioremediation

2.1 L'évolution de la biomasse bactérienne

La biomasse microbienne est un paramètre qui permet d'estimer la flore viable du sol, de se fait, nous avons effectué un dénombrement microbien en UFC/g dans les échantillons de sol, afin d'étudier le comportement des microorganismes en présence des polluants comme seule source de carbone.



Figure 20 : Dénombrements des souches bactériennes sur gélose nutritive (bioaugmentation pétrole à T45).

La technique des du comptage en surface permet de connaître le nombre d'unités prélevées pouvant former une colonie sur gélose (UFC).

La technique des du comptage en surface permet de connaître le nombre d'unités prélevées pouvant former une colonie sur gélose (UFC).

Les résultats de l'évolution du nombre microbienne de nos souches en fonction du temps dans les sols contaminés et le sol témoin pendant les 45 j d'expérimentation sont récapitulés dans les tableaux 9,10 et la figure 21

Tableau 9 : Nombre de microorganismes de chaque dilution du sol.

dilution	Témoïn				ATT.P				BIO.P				ATT.K				BIO.K			
	T0	T15	T30	T45	T0	T15	T30	T45	T0	T15	T30	T45	T0	T15	T30	T45	T0	T15	T30	T45
10⁻¹	>300	185	>300	>300	>300	10	>300	36	La charge initiale du sol	223 pigment rouge	>300	>300 pigment rouge et vert	>300	>300	>300	134	La charge initiale du sol	219 4 pigment rouge	>300	>300
10⁻²	112	13	>300	50	112	0	43	20	+	30 Pigment rouge	44 pigment Vert	50 Pigment vert	112	2	44	3	+	4	11	119
10⁻³	12	4	7	24	12	0	6	10	La taille d'inoculum	0	20 Colonies vertes	25 colonies vertes	12	0	9	0	La taille d'inoculum	0	0	0
10⁻⁴	0	0	0	0	0	0	1			0	1	6	0	0	2	0		0	0	0
10⁻⁵	0	0	0	0	0	0	0			0	0		0	0	0	0		0	0	0
10⁻⁶	0	0	0	0	0	0	0			0	0		0	0	0	0		0	0	0
10⁻⁷	0	0	0	0	0	0	0			0	0		0	0	0	0		0	0	0

Tableau 10 : Dénombrement de la flore dans les échantillons du sol en UFC/g.

	Témoïn	ATT.P	BIO.P	ATT.K	BIO.K	
Le nombre de micro-organisme en UFC /g	T0	1.12×10^7	1.12×10^7	1.12×10^8	1.12×10^7	1.12×10^8
	T15	1.85×10^6	0	2.53×10^6	0	2.19×10^6
	T30	0	4.30×10^6	6.4×10^6	4.4×10^6	0
	T45	7.7×10^6	5.6×10^5	7.5×10^6	1.34×10^6	1.9×10^7

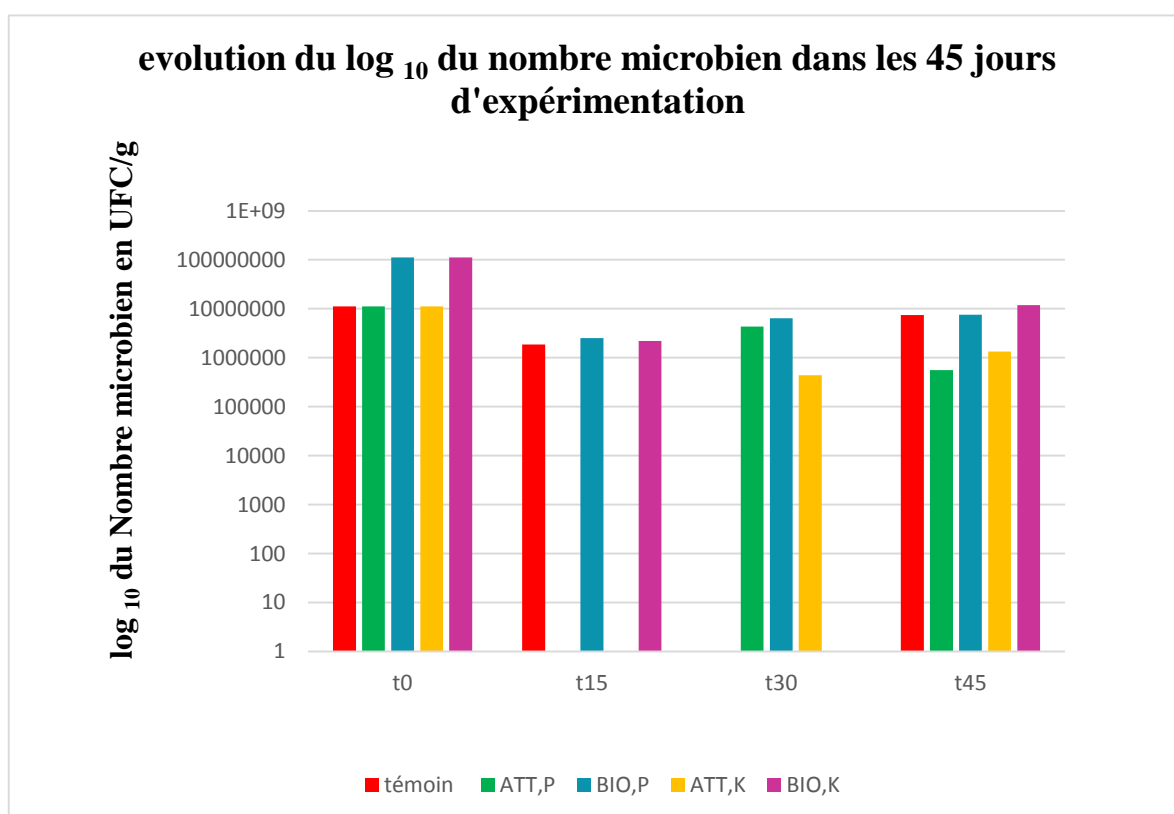


Figure 21 : Digramme en bâtonnets représentant l'évolution de la biomasse microbienne dans les échantillons du sol au cours des 45 j d'expérimentation.

3. Test de germination

L'objectif de cette approche est d'évaluer l'efficacité des techniques de décontamination adoptées dans notre expérience dans les sols pollués par le pétrole et le kérosène. Ce test concerne la germination des graines d'orge (*Hordeum vulgare*) (Figure 22).

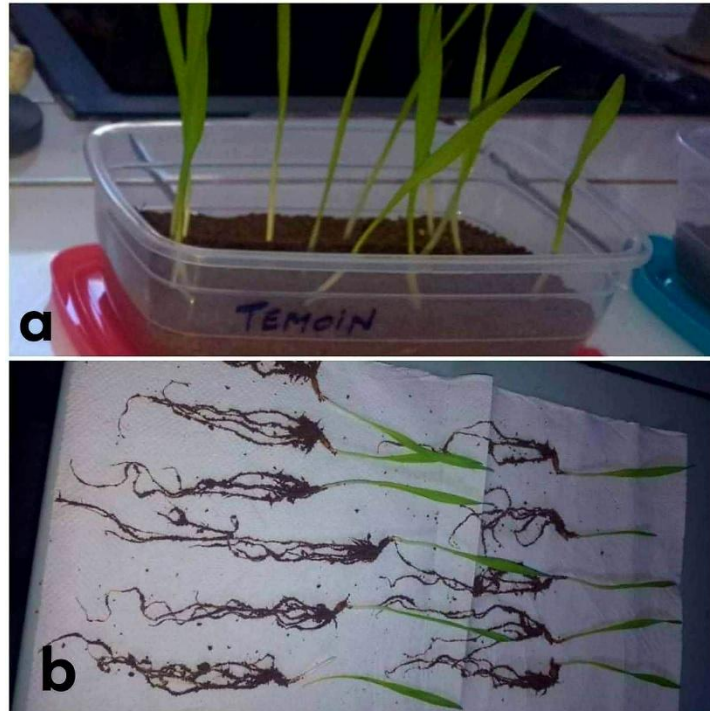


Figure 22 : a : Résultat de la germination des grains dans le sol non pollué à T0 ; **b :** La longueur des racines et la partie aérienne.

Des mesures de moyenne des longueurs de la partie aérienne et racinaire et l'indice de germination ont été établies.

3.1 La longueur des parties aériennes et racinaires

La longueur de la partie aérienne et racinaire des grains germés dans le sol témoin et les sols contaminés est mesurée chaque 15 jour durant toute la période d'expérimentation. Les moyennes de ces valeurs sont calculées et présentés dans le tableau 11.

3.2 L'indice de germination

L'indice de germination est un paramètre qui permet l'évaluation de la capacité d'une graine d'orge à germer dans différents types de sols. Les valeurs calculées pour cet indice figurent dans le tableau 12.

Tableau 11 : La moyenne des longueurs de la partie aérienne et racinaire de l'orge durant les 45 jours d'expérimentation.

Type de traitement	La moyenne des longueurs de la partie aérienne (cm)				La moyenne des longueurs racinaires (cm)			
	T0	T15	T30	T45	T0	T15	T30	T45
Témoin	11.06	10.54	13.60	12.85	13.70	13.21	16.68	12.78
ATT.P	0	3.40	9	8.51	0	3.92	8.71	8.48
BIO.P	0	4.29	7.22	9.39	0	6.26	7.37	10.77
ATT.K	0	0.058	1.025	4.60	0	0.3	0.96	3.18
BIO.K	0	0.13	0.21	6.25	0	0.20	0.39	4.22



Figure 23 : Résultat de la germination de tous les grains dans le sol non pollué et pollué par le pétrole et le kérosène à T45.

Tableau 12 : L'indice de germination des grains d'orge semés dans le sol non pollué et pollué pendant les 45 j d'expérimentation.

	L'indice de germination (%)				
	Témoin	ATT.P	BIO.P	ATT.K	BIO.K
T0	100	0	0	0	0
T15	100	28	49	1.13	0.75
T30	100	55	42	3.13	1.58
T45	100	66.35	84.27	24.33	33

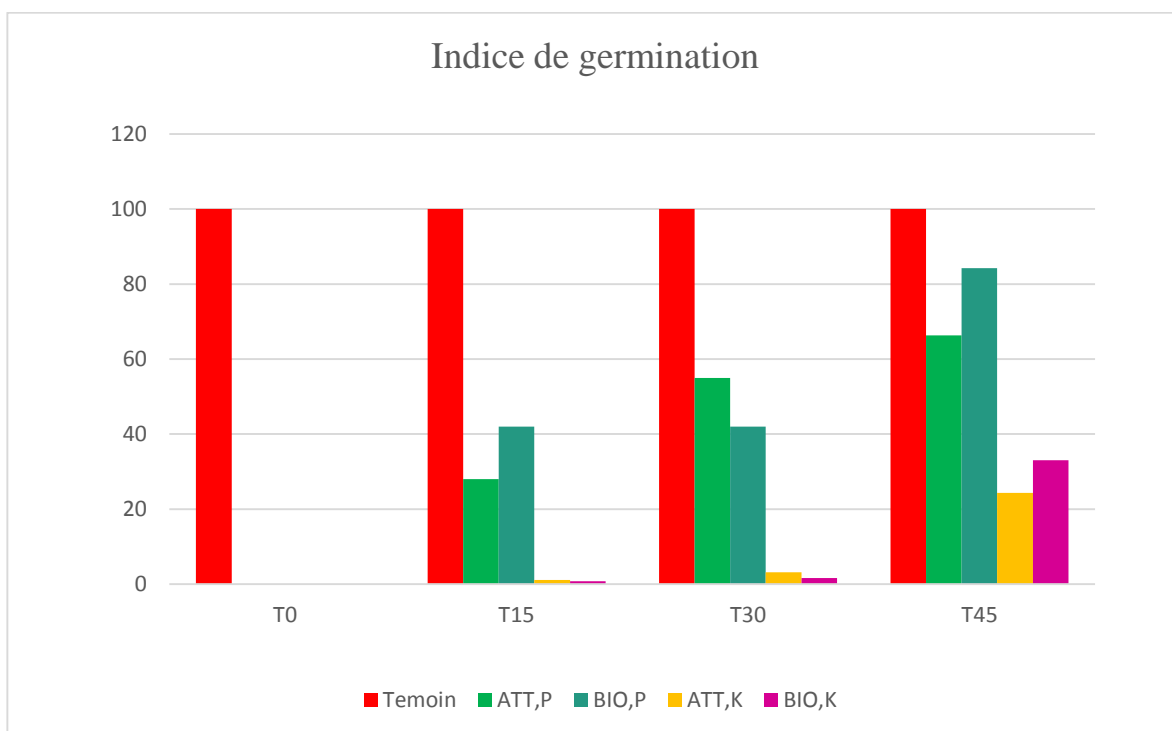


Figure 24 : Diagramme en bâtonnets représentant l'indice de germination des grains d'orge semés dans le sol non pollué et pollué pendant les 45 j d'expérimentation.

4. Interprétation

4.1 Le dénombrement microbien

A T₀

D'après nos résultats nous remarquons que l'évaluation quantitative de la microflore indigène du sol à T₀ révèle un nombre important de colonies développées. Le nombre estimé de microorganismes est respectivement 1.12×10^7 UFC/g dans les bacs de traitement négatif (témoin), ATT.P, et ATT.K.

Les autres bacs de traitement BIO.P et BIO.K sont additionnés d'un inoculum bactérien standardisé à une valeur de D.O de (0.1) ce qui correspond à (10^8) selon Mac Ferland.

Donc leur charge microbienne totale est de 1.12×10^8 UFC/g.

A T₁₅

Après 15 jours, l'évolution de la biomasse des traitements ATT.P, BIO.P, ATT.K, BIO.K est moins importante, elle montre une diminution remarquable. Cela indique qu'il y'a eu peut être une période d'adaptation de la microflore de sols au stress provoqué par les

polluants et la présence de nombreux facteurs influencent son efficacité au fil du temps, comme certaines modifications des conditions environnementales, d'habitats, et d'atmosphère etc.

Les résultats obtenus pour le traitement ATT.P sont négligeable, il y'avait un taux de croissance à T0 puis il a diminué d'une façon accrue. En comparant ces résultats à celles obtenus dans le traitement BIO.P dont la charge microbienne est de 2.53×10^6 UFC/g, nous supposons que cela revient à la capacité d'adaptation du consortium bactérien utilisé ainsi que sa bonne tolérance au pétrole, du fait qu'il est constitué de souches performantes isolées à partir de zones polluées par le pétrole brut.

Parallèlement, les traitements ATT.K et BIO.K montre des résultats totalement différents.

Dans le bac de traitement ATT.K, une augmentation de la charge microbienne est observée ainsi que pour le traitement BIO.K avec une valeur de 2.19×10^6 UFC/g, ce qui renseigne sur la capacité des bactéries indigènes et exogènes à s'adapter à la présence du kérosène.

En outre, la comparaison entre les deux traitements ATT.P et ATT.K nous montre que la microflore indigène du sol est capable à utiliser le kérosène comme source de carbone mieux que le pétrole.

La charge microbienne mesurée dans les bacs de traitement BIO.P et BIO.K est respectivement 2.53×10^6 et 2.19×10^6 UFC/g. Ces résultats rapportent sur la tolérance et le pouvoir de nos souches bactériennes à croître en utilisant le pétrole et le kérosène comme source de carbone et d'énergie.

Nous constatons aussi une dominance de la bactérie *Serratia marcescens* dans le traitement BIO.P facilement reconnue grâce à son pigment rouge.

Une diminution de charge microbienne est constaté dans le bac témoin est de 1.85×10^6 UFC/g.

A T₃₀

Après 30 jours d'expérimentation, la croissance de la charge microbienne a augmenté progressivement dans les traitements ATT.P, BIO.P, et ATT.K, avec des valeurs comme suit 4.3×10^6 , 6.4×10^6 , 4.4×10^6 UFC/g.

Pour le traitement ATT.P et BIO.P la biomasse microbienne de la bioaugmentation reste toujours supérieure à celle de l'atténuation naturelle ce qui parait très logique.

Par ailleurs, une augmentation de charge microbienne pour le traitement ATT.K est aperçue, ce que démontre le pouvoir de ces souches indigènes à dégrader ce polluant.

A T₄₅

Nous commençons tout d'abord, à constater une augmentation de 7.4×10^6 UFC/g dans le bac témoin.

La variation de croissance des microorganismes dans les quatre traitements ATT.P, BIO.P, ATT.K, BIO.K après 45 jours d'expérimentation a montré une augmentation importante surtout dans les bacs BIO.P et BIO.K elle était à 7.5×10^5 et 1.19×10^6 UFC/g respectivement. Cependant les traitements ATT.P et ATT.K leur croissance était limité par rapport à T30, elle est 5.6×10^5 et 1.34×10^6 UFC/g.

L'augmentation de la charge microbienne dans les deux traitements de bioaugmentation (BIO.P et BIO.K) témoigne sur le pouvoir adaptatif des bactéries exogènes exposées à long terme à ces deux polluants qui a fini par un développement des capacités de dégrader et utiliser le pétrole et le kérosène comme source de carbone. Ces données confirment également la préférence de nos souches, la source la plus simple que la plus complexe.

Par ailleurs, la diminution de la biomasse dans les deux traitements d'atténuation naturelle (ATT.P et ATT.K) par rapport à celle obtenus à T30 peut être due au fait que ces bactéries proviennent de sol non pollués et donc elles ne sont pas adaptées à la présence des polluants ce qui a affecté la croissance de la microflore indigène du sol en présence du pétrole et le kérosène.

Vu que le genre *Pseudomonas* est capable de synthétiser un pigment vert, cette capacité est révélée par la diffusion de la couleur vert sur la gélose ainsi que la coloration de quelques colonies. Cette pigmentation est observée dans le traitement BIO.P à T30 et T45, avec une dominance par rapport au nombre des colonies de *Serratia marcescens* présentes.

4.2 Le test de germination

Au départ de l'expérience, nous constatons une germination totale des graines d'orge semées avec un indice de germination égale à 100% dans le bac témoin qui n'est pas traité par les polluants, contrairement aux autres bacs ATT.P, BIO.P, ATT.K, BIO.K où nous remarquons que la germination est nulle.

L'absence de germination dans les bacs ATT.P, BIO.P, ATT.K, BIO.K est expliquée par l'impact toxique et l'effet inhibiteur du polluant sur les graines, quand à la germination totale dans le bac témoin qui est due aux conditions favorables et à l'absence du polluant ce qui a aidé les graines à germer normalement.

La germination durant la période allant de T15 jusqu' à T30 s'est amélioré.

A T15 et à T30 nous apercevons une germination optimale à 100% des graines au Bac témoin. Cependant, la germination dans le bac ATT K était légèrement plus importante par rapport au traitement BIO.K avec des indices de germinations qui sont respectivement à 1.13 % et 0.75 % à T15 et 3.13 % et 1.58 % à T30. La germination dans le bac du traitement ATT P qui s'avère moins importante que celle dans le bac BIO P avec des indices de germination qui sont respectivement égales à 28 % et 49 % à T15, nous constatons une amélioration dans le bac ATT P avec un indice de germination de 55% à T30.

En comparant les résultats des deux traitements à T15 et T30 (les traitements d'atténuation naturelle et de bioaugmentation pour les bacs des deux polluants), les indices de germinations obtenus démontrent clairement que la germination dans les bacs traités avec du pétrole s'avère bien meilleure que celle du bac traité avec le kérosène bien que le kérosène représente un dérivé du pétrole donc sa structure est plus simple.

Cela nous fait penser que le traitement de la bioaugmentation dans le bac BIO P était le plus efficace.

Les résultats obtenus révèlent que l'effet dégradant de la microflore indigène du sol et le consortium bactérien injecté commence à partir de 15 jours donc à T 15, d'autant elles sont dotés d'une affinité pour le pétrole par contre mais elles montrent une affinité réduite pour le kérosène.

A T45, le témoin présente un indice de germination égale à 100 %

Dans le cas du pétrole, on observe que la valeur de l'indice de germination dans le bac BIO.P (84.27 %) est supérieure à celle du bac ATT.P (66.35 %) ; les valeurs montrent que les deux traitements étaient bénéfiques et efficaces mais la bioaugmentation était largement plus active que l'atténuation naturelle.

Dans le cas du kérosène, l'indice de germination dans le bac BIO K est à 33% et 24.33 % pour le bac ATTK, cela démontre que la bioaugmentation est plus active que l'atténuation naturelle.

En comparant les résultats de l'atténuation naturelle et de la bioaugmentation dans les bacs BIO.P ATT.P BIO.K ATT.K on déduit que le traitement de la bioaugmentation et l'atténuation naturelle dans les bacs pollués par le pétrole est largement plus active et efficace que dans les bacs pollués avec du kérosène.

Nous pensons qu'il y'a une préférence et une affinité de la bactérie vis-à-vis du polluant. Les bactéries utilisées ainsi que la flore autochtone du sol dégradent le kérosène mais ont plus d'affinité pour le pétrole.

Cela peut être dû à la structure du polluant et des enzymes ainsi qu'aux voies de biodégradation empruntées par les bactéries.

5. Discussion

Les microorganismes jouent un rôle important dans la bioremediation des milieux pollués par les hydrocarbures. Plusieurs d'entre eux sont largement distribués dans la nature, et ont la capacité d'utiliser les hydrocarbures comme seule source d'énergie et de carbone pour leurs activités métaboliques (Jyothi *et al.*, 2012).

Dans le cadre de cette étude, un consortium bactérien composé de 3 souches isolées à partir des zones polluées par les hydrocarbures est utilisé pour évaluer leur capacité à dégrader et utiliser le pétrole et le kérosène comme source de carbone, également nous avons testé le pouvoir des bactéries indigènes du sol.

Nous avons choisi des bactéries à Gram négatif pour la réalisation de cette expérience. Ce choix est fondé sur des connaissances acquises à propos des milieux pollués par les hydrocarbures, la caractérisation morphologique de nos souches nous a permis de confirmer que ces bactéries appartiennent au groupe des bactéries Gram négatifs. Ce qui est en accord avec les résultats décrits par Margesin *et al.*, (2003) qui ont montré la prédominance des Gram négatifs et en particulier du groupe phylogénique Proteobacteria et leur capacité accrue à minéraliser ces composés.

La biodégradation du pétrole et kérosène est observée par l'augmentation significative de la charge microbienne après 45 jours d'expérimentation pour le traitement de la bioaugmentation. Les études réalisées par Xu (2012) pour évaluer la biodégradation de pétrole brut par les bactéries montrent que la concentration des bactéries en présence de pétrole comme source de carbone a augmenté progressivement, à mesure que le temps de bioremediation progresse.

Nos résultats nous ont permis de constater que les deux souches bactériennes *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia marcescens* commencent à dégrader le pétrole et le kérosène après 15 à 21 jours. Cette constatation correspond avec les résultats obtenus par Wongsa *et al.*, (2004) que le kérosène et certains dérivés du pétrole brut pourraient être dégradés et utilisés comme seule source de carbone après 2 à 3 semaines.

Par ailleurs, nous remarquons aussi la synthèse du pigment rouge par *Serratia* et vert par les deux *Pseudomonas* précisément lors de la dégradation du pétrole. La diffusion du pigment vert sur la gélose était plus intense surtout après 30 et 45 jours de traitement. Ces résultats se concordent avec les observations de Rahman *et al.*, (2002) ; Kayode-Isola *et al.*, (2008) ; John *et al.*, (2011) que les souches *Pseudomonas sp* présentent les plus grandes concentrations bactériennes et les plus grandes capacités à dégrader le pétrole brut.

Cette constatation est en accord également avec les résultats de Das et Mukherjee (2007) ; Mandri et Lin (2007) ; Bak *et al.*, (2015), qui rapportent que plusieurs souches de *Pseudomonas* (spécialement *Pseudomonas aeruginosa*) isolées à partir des sols contaminés, sont capables de pousser et de dégrader les hydrocarbures pétroliers ainsi que de remédier les sols contaminés par ces composés.

Comme nous avons effectué un traitement d'atténuation naturelle afin d'évaluer la capacité des bactéries indigènes du sol à dégrader le pétrole et le kérosène, les résultats obtenus sont significatifs et confirment le pouvoir de la microflore indigène de se développer à la présence des hydrocarbures pétroliers. Ainsi, nous retrouvons des travaux récents de Pinon-castillo et ses collaborateurs (2017) qui valorisent les résultats d'atténuation naturelle après un an d'étude et confirment la performance des bactéries indigènes à dégrader les hydrocarbures.

Afin de mettre en valeur le pouvoir dépolluant de la flore indigène du sol et celui du consortium bactérien et leurs capacités à remédier les sols pollués, une teste de germination était effectué.

En comparant les résultats obtenus au début de l'expérimentation c'est-à-dire à T_0 avec ceux de Sharifi *et al.*, (2007) et Agbogidi, (2013) nous déduisons que le polluant a un effet néfaste sur les graines d'orges, ce dernier par son effet toxique, inhibe ou retarde la germination lors de son contact avec l'embryon de graines en le couvrant avec une couche, ce qui affecte les fonctions physiologiques de ce dernier.

Nous constatons une la germination des graines à T15 et une amélioration remarquable à T30 dans tous les bacs (ATT.P BIO.P ATT.K BIO.K); nous déduisons par cela que la microflore indigène du sol ainsi que *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa* avaient commencé à dégrader le kérosène présents dans le sol à partir de T₁₅ et la cinétique de dégradation avait augmenté progressivement dans les deux semaines qui suivent.

Les traitement d'atténuation naturelle et de la bio augmentation appliquée sur les sols pollués par le pétrole semblent plus efficaces par rapport aux traitements appliqués sur les bacs pollués par le kérosène, nous réalisons que la microflore indigène ainsi que *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa* ont une affinité pour le pétrole, ces constatations sont confirmées dans les résultats de Wongsu et al., (2004).

La technique de la bioaugmentation présente les meilleurs résultats, nous déduisons par cela que l'ajout du consortium bactérien (*Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa*) à améliorer la qualité du sol et a contribué à sa remédiation par le pouvoir dégradant des souches particulièrement *Pseudomonas aeruginosa* qui dégrade plus rapidement le pétrole.

En effet, selon Ruohai Song et al., (2006), les hydrocarbures pétroliers désignent un mélange complexe de composés susceptibles de contaminer le sol, ils sont nombreux et diverses en raison des activités humaines multiples qui peuvent en être la source. La biodégradation de ces polluants implique une microflore diversifiée.

CONCLUSION

Conclusion

L'objectif de ce modeste travail était la bioremediation de deux types de sol artificiellement pollués par le pétrole brut et le kérosène en utilisant un consortium bactérien composé de trois souches isolées d'un site contaminé par les hydrocarbures.

Dans un premier volet, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des trois souches par un examen morphologique des colonies après croissance sur gélose nutritive, et les cellules après coloration de Gram.

La deuxième partie aborde la bioremediation de ces deux sols par des traitements appliqués durant les 45 jours d'expérimentation.

Il s'agit principalement :

- La bioaugmentation par le consortium bactérien d'un sol pollué par le pétrole brut.
- La bioaugmentation par le consortium bactérien d'un sol pollué par le kérosène.

Ce traitement était comparée à un sol pollué par le pétrole et le kérosène et non traité où l'activité sera due à la microflore indigène (atténuation naturelle) et un sol témoin non pollué et non traité.

L'efficacité de la bioremediation a été évaluée par des tests biologiques, comme le suivi du nombre microbien, et de la germination de graines d'orge avec des mesures des longueurs de la partie aérienne et racinaire ainsi qu'un calcul de l'indice de germination.

Le suivie de la charge microbienne après dénombrement était significative durant les 45 jours.

L'inoculation des sols pollués par le consortium bactérien n'a pas eu l'effet améliorant attendu, mais ces résultats affirment quand même le pouvoir des souches à dégrader le pétrole.

L'évolution de la biomasse microbienne pendant l'atténuation naturelle des deux traitements par le pétrole et le kérosène était moins importante que les procédés de bioaugmentation des sols contaminés par ces deux polluants.

Par ailleurs, un autre test biologique est effectué pour évaluer l'efficacité de la bioremediation ainsi que l'effet inhibiteur du pétrole et le kérosène sur les activités du sol. Il s'agit du test de germination des graines d'orge dans ses sols là.

Il ressort que les résultats sont significatifs en comparant avec le sol témoin donc ils confirment l'efficacité des traitements pour réduire la teneur du pétrole et le kérosène pendant les 45 jours.

La bioremediation est un procédé qui prend de l'ampleur pour la dépollution des sols et permet de remédier les sols pollués par les hydrocarbures en faisant appel aux microorganismes qui sont capables de décomposer la plupart des hydrocarbures pétroliers pour les transformer en composés moins toxiques. Cependant, cette technique pose des problèmes :

L'une des principales limites de la bioremediation est le temps, il faudra plus de temps pour atteindre le niveau de dégradation souhaité

Non seulement elle se limite uniquement qu'aux composés biodégradables mais aussi, cette technique est largement coûteuse, sur terrain, la bioremediation nécessite des volumes considérables de consortium bactérien ; d'un autre côté les souches deviennent dangereuses à des concentrations très élevées et propagent dans la biomasse végétale et diffusent dans le sol pour atteindre les nappes phréatiques, la contamination des plantes et des eaux par les souches bactériennes présente un risque sur l'environnement et la santé des animaux et des humains.

A la base des résultats obtenus précédemment, nous pouvons à la fois tirer quelques recommandations et mesures prioritaires à mettre en avant, et souligner un nombre de perspectives pour la suite de notre étude.

- Suivre la bioremediation pour une période plus longue.
- Il serait intéressant de mesurer la capacité de dégradation des microorganismes sélectionnés en réponse à l'effet polluant ou stimulant de l'hydrocarbure par d'autres méthodes, comme le dosage des hydrocarbures totaux résiduels, la détermination de la demande chimique en oxygène (DCO).
- La microflore indigène de sol sur laquelle survient un déversement constitue l'acteur principal du processus d'atténuation naturelle. C'est la raison pour laquelle, il est important d'essayer d'appliquer au niveau national les microorganismes dégradants les hydrocarbures dans le traitement des sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers et d'améliorer l'efficacité du traitement par bioremediation.

- Une approche moléculaire sera prometteuse, tel que l'utilisation de la génomique et métagénomique pour l'identification rapide des souches capables à dégrader les hydrocarbures
- L'amélioration de l'efficacité de la bioremediation avec l'utilisation de microorganismes génétiquement modifiés par l'intégration des gènes de dégradation d'hydrocarbures.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

ALI AHMED, Samira, 2011. *Essai de réhabilitation d'un sol contaminé par les hydrocarbures à l'aide de tensioactifs obtenus par voie biologique*. Thèse de Magistère : science de sol. Université Algérienne, 36p.

American petroleum institute ,1962 .*glossary of terms used in petroleum refting*. 2éme edition: Baltimore

AGBAGIDI, O.M., IONDU, E. M,2013,. *Effects of spent engine oil on the germination and seedling growth of Moringa oleifera (Lam.)* *Scholarly Journal of Agricultural Science*, 3(6).239-243p.

AMIR,A,2011,*etude expérimentale et modélisation de la cinétique de combustion d'alcanes lourds, de kérosènes reformulés et de carburants-modèles-Formation des polluants*.Thèse de doctorat .sciences et technologies :Université d'Orléans.24, 25,30,31p.

AOUN, M ,2009, *action du cadmium sur les plants de moutarde indienne néoformés à partir de couches cellulaires minces et issus de semis* .Thèse de doctorat. Analyses physiologiques et rôle des polyamines.. Université de Bretagne occidental.

AZUBUIKE,C.C., CHIKERE, C.B., OKPOKWASIKI, G.C , 2016, *Bioremediation techniques–classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11).180p.

ATLAS, R .M .and Bartha, R,1972, *Biodegradation and mineralization of petroleum in sea water at low temperature*. *Canadian Journal of Microbiology*, 18.1851-1855p.

B

BAK, F., BONNICHSEN, L., JØRGENSEN, N.O.G. et al, 2015. The biosurfactant viscosin transiently stimulates n-hexadecane mineralization by a bacterial consortium. *Appl Microbiol Biotechnol*.Vol. 99, p. 1475–1483. DOI: 10.1007/s00253-014-6054-3

BATAH, R, 2016,*Identification et profil de résistance de Serratia marcescens aux antibiotiques*.Thèse de doctorat.microbiologie appliquée. Université Badji Mokhtar Annaba. 6p.

BENCHOUK, Amina, 2017. *Bioremediation des sols pollués de pétrole par les microorganismes indigènes amélioration de leur pouvoir*. Thèse de doctorat.Microbiologie appliquée. Mostaganem : Université d'ibn Badis Mostaganem, 32,35p.

BIRECHE, Yamina., BERREGUI, Fatiha, 2014. *Effets de la salinité sur l'activité des bactéries hydrocarbonoclastes* .Mémoire de master académique. Microbiologie appliquée. Ouargla : Université Kasdi Merbah Ouargla, 12p.

BORDENAVE, S., GOÑI-URRIZA, M.S., CAUMETTE, P. et al, 2017. Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Environmental Microbiology*. Vol.73 N° 19, p 6089–6097. DOI : 10.1128/AEM.01352-07

BOUDERHEM, A,2011, *Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodetection et la bioremediation des sols pollués par les hydrocarbures*. Mémoire de magister .microbiologie appliquée :Université Kasdi Merbah d’Ouargla.3,4,5,6 ,16p.

C

CALVET, R,2003,*le sol propriétés et fonction : contribution et structure, phénomènes aux interfaces*. France : France agricole/ DUNOD.88p.

CHADLI, Aicha, 2015. *Isolement et caractérisation des bactéries biodégradantes d’hydrocarbures à partir de lixiviat du centre d’enfouissement technique d’Ain Témouchent*. Thèse de doctorat. Microbiologie appliquée. Oran : Université d’Ahmed Benbella d’Oran, 54p.

CHAILLAN, F., LE FLECHE, A., BURY, E. et al ,2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon degrading microorganisms. *Research in Microbiology*. Vol. 155 N° 7, p 587–595. DOI: 10.1016/j.resmic.2004.04.006

COLOMBANO, S., SAADA, A., GUERIN. et al, 2008. Quelles techniques pour quels traitements? Analyse coûts- bénéfiques .BRGM /RP-58609-FR. P 35

COLOMBANO, S., SAADA, A., GUERIN, V., BATAILLARD, P., BELLENFANT, G., BERANGER, S., HUBE, D., BLANC, C., ZORING, C., GIRARDEA, U,2008, *Quelles techniques pour quels traitements? Analyse coûts- bénéfiques* .BRGM /RP-58609-FR.35p.

COMEAU, Y, 1999. *Biorestauration des sols contaminés. Cours professionnel à l’école polytechniques*. Etude supérieur génie de l’environnement. Montréal.

CZAPLICKI LAUREN M., GUNSCH CLAUDIA K, 2016. Reflection on molecular approaches influencing state-of-the-art bioremediation design: culturing to microbial community fingerprinting to omics (Doctoral dissertation, American Society of Civil Engineers).

D

D’ANNIBALE, A., ROSETTO, F., LEONARDI, V. et al, 2006. Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.72 N° 1, p28–36. DOI: 10.1128/AEM.72.1.28-36.2006

DANIEL, R,2005, *The metagenomics of soil*. *Nature Reviews Microbiology*, (3), 8-470p

DAS, K., MUKHERJEE, K, 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil

from North-East India. *Bioresource Technology*. Vol. 98 N° 7, p 1339–1345. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.05.032

DAS, Nilanjana, CHANDRAN, Preethy, 2011. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants. *Biotechnology research international*. Vol. 2011, p 1-13. DOI: 10.4061/2011/941810

DAUDIN, R.. Pétrole le raffinage , *Encyclopædia Universalis* [en ligne] (page consultée le 28 mai 2019) <https://www.universalis.fr/encyclopedie/petrole-le-raffinage/>

Document de TOTAL,2007, *Manuel de formation ;Course xp-pr-eq090;p4-97*

DUFRESNE, Myriam, 2013. *Les technologies de traitement des sols contaminés : Lesquelles sont durables*. Maître en environnement. Université de Sherbrooke, 13p.

E

EDWARDS, T AND MAURICE, L.Q,2001,*Surrogate Mixtures to Represent Complex Aviation and Rocket Fuels*. Journal of Propulsion and Power. (17), 461-466 p.

EL FANTROUSSI, S., AGATHOS, S.N, 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. *Curr Opin Microbiol*. Vol. 8, p268-275. DOI : 10.1016/j.mib.2005.04.011

EMBREY, M., HUNTER, P., SELLWOOD, J., WYN-JHONAS,P ,PERCIVAL, S.L., CHALMERS.R ,2004,*Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks*,Elsevier.

F

FADEL,N,2010, *Etude de l'influence de la température du fluide sur la performance d'un échangeur de chaleur de la raffinerie d'Alger.Mémoire d'ingénieurat .génie chimique* :Université des sciences et de technologie houari boumedienne d'Alger.1p.

FAVENNEC, J.P, COPINSCHI, P,2003, *Les nouveaux enjeux pétroliers en Afrique, Politiqueafricaine n°89*

FOKOU MBOGNE, Pancale martial, 2017. *Bioremédiation augmentés des sols contaminés aux hydrocarbures lourds par ajout de substrat organiques*. Mémoire de maîtrise électronique. Université du Québec, 18p.

G

GABET, Sophie, 2004. *Remobilisation d'hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique*. Thèse de doctorat. Chimie et Microbiologie de l'Eau. Université de Limoges, 38-43p.

GEORGES, M., B. *La gazette du laboratoire archive* .[en ligne] disponible sur <https://www.gazettelabo.fr/archives/pratic/1995/2hydroc.htm?page> (consultée le 19 avril 2019)

GIRI, A.V., ANDKUMARN, N., MUTHUKUMARAN, G., PENNATHUR, G., 2004, *A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from Serratia marcescens isolated from soil*. BMC Microbiology, 4.11 p.

GOBAT, J.M., ARAGNO, M., MATTHEY, W., 2003, *Le sol vivant : Bases de pédologie, Biologie des sols*. Presses polytechniques et universitaires romandes (Ed). 528p.

GRACIA-SALCEDO, M., J. MCBRIDE, A., 1988, *Brabbs Experimental verification of the thermodynamic properties of Jet A Fuel*: NASA Technical Memorandum .

GUERET, C., 1989, *Elaboration d'un modèle cinétique pour l'oxydation du kérosène et d'hydrocarbures représentatifs*, Thèse : Université d'Orléans.

H

HAMITOUCHE, G., 2018, *Comparaison de l'efficacité des techniques de dépollution (Phytoremédiation, Biostimulation et Bioaugmentation) d'un sol contaminé aux hydrocarbures*. Mémoire de master . Biodiversité et Environnement : Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou . 08p.

HARITASH, A.K., KAUSHIK, C.P., 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 169 N°1, p 1-15. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.03.137

HASSAINE, A., 2016, *Biodégradation des Hydrocarbures (Pétrole brut et Kérosène) par la Microflore Microbienne des Eaux de la région de Skikda* . these de doctorat . Biologie végétale : Université de Annaba. P126.

HAWROT, M., NOWAK, A., 2005. Effects of different soil treatments on diesel fuel biodegradation. *Polish Journal of Environmental Studies*. Vol. 15 N°4, p 643-646.

HEIDER, J., SPORMANN, A. M., BELLER, H.M. et al, 1999. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology*. Vol. 22 N°5, p 459-473.

HEJAZI, A., FALKINER F.R., 1997, *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol* (46)903-912.

HENTATI, D., 2018. *Isolement et caractérisation des bactéries marines hydrocarbonoclastes, production des biosurfactants et l'étude de la biodiversité microbienne au sein de trois ports à Sfax, Tunisie*. Thèse de doctorat. Biotechnologie et microbiologie. Montpellier : Université du Montpellier, 21p.

J

JEAN-JACQUES, L. 2000. *Transfusion sanguine: une approche sécuritaire*, Montrouge, France: J. Libbey Eurotext.

JOHN,G.H ,1994,*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9 Edition.

JOUSSE, Flore, 2016. *Processus physico-chimiques à l'origine des différences d'efficacité des techniques de traitement de sols pollués aux hydrocarbures*. Thèse de doctorat.science et technologie. Bordeaux : Université de Bordeaux Montaigne, 40p.

JYOTHI, K., SURENDRA, B., NANCY, C.K., KASHYAP, A,2012,*Identification and isolation of hydrocarbon degrading bacteria by molecular characterization.Helix*, (2), 105-111p.

K

KARIGAR, C. S., RAO, S. S, 2011. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants. *Enzyme research*. Vol. 2011, p11.

KORDADE, D.L., FULKAR, M.H,2009, *Effect of organic contaminants on seed germination of Loliummultiflorum in soil*.Environmental Biotechnology Laboratory.Department of Life Sciences:University of Mumbai.

L

LALAOUI, S,2015,*Caractérisation physicochimique des carburants des véhicules cas essence super et gazole* .Mémoire de master. analyses chimiques : Université de Bejaia.2,3,5 p.

LEAHY, J.,OLWELL,R,1990, *Microbial degradation of hydrocarbons in the environment*. *Microbiological Reviews*, 54(3), 305-315p.

M

MANDRI, T., LIN, J, 2007. *Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microrganisms in Kwazulu-Natal, South Africa*. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 6 N°1, p023 -027. DOI: 10.5897/AJB07.728

MARCH, N., al,1982,*Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries*. Paris : Doin .

MARGESIN, R., SCHINNER, F, 2001. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel -Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 67 N°7, p3127-3133.

MARTEL , C.R,1988,.*Molecular weight and average composition of JP-4, JP-5, JP-8 and Jet A*, AFWAL/POSF Report

MEZAACHE,S ,2016,*Polycopie de microbiologie environnementale destinée aux étudiants de la 3ème année*. Licence : microbiologie et microbiologie appliquée. Université de Ferhat Abbas, Setif.

MILITON, Cécile, 2007. *Caractérisation des communautés procaryotiques impliqués dans le bioremediation d'un sol pollué par des hydrocarbures et développement d'outils d'analyse haut*

débit : les biopuces ADN. Thèse de doctorat.génomique et écologie microbienne. Université Blaise Pascal, 16,19p

MIRABAUD, M.I ,2011, *Entérobactéries à Béta-lactamases à spectre élargi en pédiatrie en 1996* .Faculté de médecine, Département de Pédiatrie .Section de médecine clinique :université de Genève.

MOHAN, S.V., KISA, T., OHKUMA, T. et al, 2006. Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Environmental Science and Biotechnology*. Vol. 5, 347-374.

MONTAGNE, X ,2011, *Carburants liquides: gazoles, jets fuels et autres distillats moyens*. BE 8 545 v2 Techniques de l'ingénieur, p 3-4.

MORLETT-CHÁVEZ, J.A., ASCACIO-MARTÍNEZ, J.A., RIVAS-ESTILLA, A.M. ET AL, 2010. Kinetics of BTEX biodegradation by a microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and bacterial strains isolated from it. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 2010 N°64, 581-587. DOI: 10.1016/j.ibiod.2010.06.010

MULLIGAN, C.N., YONG, R.N, 2004. Natural attenuation of contaminated soils. *Environ Int*, Vol. 30 N°4, p587-601. DOI:10.1016/j.envint.2003.11.001

MURIEL, F, 2007,*avantages environnementaux et séquestration du carbone ,mémoire Master en Sciences et Gestion de l'Environnement* : Université Libre de Bruxelles.

N

NGUYEN, YING,1990, *Critical evaluation of Jet A spray combustion using propane chemical kinetics in gas turbine combustion simulated by KIVA-II*, 26th Joint Propulsion conference, July 16-18 Paper AIAA-90-2439, Orlando, FL

NIKITHA, T., SATYAPRAKASH, M., VANI, S.S., SADHANA, B., PADAL, S,2017, *A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: their transport, fate and biodegradation in the environment*. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 6(4), 1627-1639p.

NUR, Humaira, . *A study on various aspects of bioremediation with microbes as a tool of effective waste management*. [En ligne] Disponible sur <http://dspace.bracu.ac.bd/xmlui/> (consulté le 26 avril 2019).

O

OULD BOUDIA, A., HAMMADI, K,2011, *Biodégradation du pétrole brut en mer par : Enterobacter cloacae, Esherchia coli et Pseudomonas spp*. *Microbial. Ind. San et Environn*, 5(1), 133- 146p.

P

PAULO, J.C., PRATAS, J., VARUN, M. ET AL,2010 . *Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora* [En ligne] Disponible sur <https://www.intechopen.com/> [Consulté le 29 mai 2019]

PEDRAZA,2008,*Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria*.*Journal of food microbiology*, 125, 25-35p.

PERFUMO, A., BANAT, I.M., CANGANELLA, F. ET AL, 2010. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP021. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 72 N°1, p 132.

PERRY, RH, CHILTON,1973, 1984,*Chilton Chemical engineers handbook* , fifthEdition, mc graw –hill.

PIÑON-CASTILLO, H.A., GUTIERREZ, D.L., ZAVALA-DIAZ DE LA SERNA, F.J. ET AL. *Laboratory-Scale Biodegradation of Fuel Oil No. 6 in Contaminated Soils by Autochthonous Bacteria*. [En ligne] Disponible sur <https://www.intechopen.com/> [consulté le 27 juin 2019]

PRESCOTT, HARLEY, KLEIN, WILEY, 2010, *Ecologie et symbiose*. In: *Microbiologie*. Traduction de la 7ème édition américaine. Bruxelles : DeBoeck.643-739p.

R

ROMERO, M.C., CAZAU, M.C., GIORGIERI, S. et al, 1998. Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. *Environmental Pollution*.Vol. 101, p 355-359.

ROMDHANE, M.,2011, *Développement industriel des produits de santé immobilisation des bactéries isolées à partir des zones minières sur des supports polymériques pour la bioremédiation* .Mémoire master professionnel :Université de la Manouba. 8p.

ROSE ,J.W .et COOPER J.R .,1977, *technical data on fuel oil* ,7 ème edition.edimbourg scottish academic press.

S

SAURET, Caroline, 2011. *Ecologie des communautés bactériennes marines soumises à une pollution pétrolière influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des pollutions*. Thèse de doctorat.microbiologie environnementale. L'université Pierre et Marie Curie, 22, 27p.

SAWADOGO, Nafissatou, 2015. *Bioremediation du cyanure sur les sites d'orpaillages au Burkina Faso : Cas du site de Zougnazagmiline*. Mémoire de master. Université Ouagadougou, 13p.

SEMION, Nathalie, 2000. *Décontamination des sols pollués par les HAP par biodégradation en présence de substrats organiques*. Maitres science. Université du Québec, p 25.

SINGH, Harbhajan, 2006. Mycoremediation: fungal bioremediation, Wiley- Interscience, New York, NY, USA.

SHARIFI, M., SADEGHI, Y., ADEGHI, M., AKBARPOUR, 2007, *Germination and growth of six plant species on contaminated soil with spent oil* .Biology. Kermanshah, Iran : Razi University, centre for Environmental Studies ,p 469-480.

SOLTANI, M., 2004, *Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes*. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de Doctorat. Université de Paris. 284p.

SONG, R., HUA, Z., et al, 2006, *Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Two Pseudomonas aeruginosa Strains with Different Uptake Modes* [en ligne] <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10934520600575135> (consulté le 20 juin 2019)

SOUICI, S., 2015, Evaluation de la phytotoxicité des hydrocarbures pétroliers sur la germination de quelque plante. Mémoire de master . Biotechnologie végétale : Université Kasdi Merba d'Ouargla, 7-8p.

SUN, W., ZHANG, S., SU, C., 2018. *Impact of Biochar on the Bioremediation and Phytoremediation of Heavy Metal (loid)s in Soil*. [En ligne] Disponible sur <https://www.intechopen.com/> [consulté le 04 mai 2019]

T

TAGHREED, A., MUFTAH, H., 2017. *Organic Contaminants in Refinery Wastewater: Characterization and Novel Approaches for Biotreatment*. [En ligne] Disponible sur <https://www.intechopen.com/> [consulté le 14 juin 2019]

TERRAT, Sébastien, 2010. *Nouveau design de sondes pour biopuces ADN fonctionnelles et caractérisation des capacités de biodégradation des communautés bactériennes de sols pollués par des hydrocarbures*. Thèse de doctorat. Génomique et écologie microbienne. Université Blaise Pascal, 13p.

TORTORA et al, 2010. *Part four: Structure and Function of the Digestive System And Normal Microbiota of the Digestive System; Part Five Environmental and Applied Microbiology*, Chapter 27: Environmental Microbiology, 1301 Sansome Street, San Francisco, CA .706- 707; 766-792p.

TISSOUT, B. *Le Pétrole brut*. *Encyclopédia universalis*. [En ligne] disponible sur <http://www.universalis.fr/encyclopedie/petrole-le-petrole-brut/> [consulté le 29 juin 2019]

V

VANDECASTEELE, J. P., 2005. *Biodegradation des hydrocarbures aliphatiques et alicycliques*. In: *Microbiologie Pétrolière*, Paris: E. Technip. 173-239p.

VACHERON et al 2013, *Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning*, *Front Plant Sci.U.K*, 4(356), 1-19p.

W

WONGSA P., et al ,2004, *Isolation and characterization of novel strains of Pseudomonas aeruginosa and Serratia marcescens possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil.* [en ligne] Disponible sur <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15696617> [page consultée le 25 juin 2019]

WUITHIER.P,1972, *le pétrole raffinage et génie chimique* (tom e1), Edition Technip.

X

XU, Jinlan, 2012. *Bioremediation of Crude Oil Contaminated Soil by Petroleum-Degrading Active Bacteria.* [En ligne] Disponible sur <https://www.intechopen.com/> [consulté le 27 juin 2019]

Y

YAMADA-ONODERA. et al, 2002. .Dégradation of long-chain alkanes by a polyethylene-degrading fungus, *Penicellium simplicissimum* YK. *Enzym and Microbial Technology*. Vol. 30 N°6, p 828-831.

YOUNG, L.Y., CERNIGLIA, C.E, 1995. *Microbial transformation and degradation of toxicorganic chemicals.* New York: Wiley.77–125p.

ANNEXE

ANNEXE

Annexe 1 : la composition des milieux de culture utilisés.

1. Bouillon nutritif (BN)

Extrait de levure	1g
Extrait de viande	0.5g
Peptone	2.5g
NaCl	2.5g
Eau distillée	500ml
pH =7.4	

2. Gélose nutritive (GN)

Gélose nutritif déshydratée	23.5g
L'eau distillée	1000ml

3. Eau physiologique

NaCl	8.5
Eau distillé	1000ml

Annexe 2 : Technique générale de préparation des bactéries pour l'observation microscopique

1. Coloration de Gram

Le protocole de cette coloration est composé de plusieurs étapes :

- Préparer et fixer le frottis bactérien à la chaleur du bec bunsen.
- Coloration par le violet de gentiane. Laisser agir 1 minute. Rincer à l'eau.
- Mordançage au lugol : étaler le lugol et laisser agir 1 minute ; rincer à l'eau.
- Décoloration à l'alcool : verser goutte à goutte d'alcool sur la lame. Puis rincer à l'eau.
- Recoloration à la fuschine. Laisser agir 1 minute. Laver doucement à l'eau. Laisser sécher la lame
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer à l'objectif x100

Les bactéries à Gram positif se colorent en violet alors que les bactéries à Gram négatif se colorent en rose.

Annexe 3 : la longueur des parties aériennes et racinaires des plantes obtenues durant les 45 j d'expérimentation.

Le témoin												
La partie aérienne (cm)	11	12	12.30	10.2	11.70	/	11.70	12	7.20	11.40	11.80	10.4
La moyenne e la partie aérienne (cm) :11.06												
Nombre des racines	6	3	4	4	4		5	4	4	5	5	4
La plus longue racine (cm)	16.5	16	16.8	13.3	15.8		18	13.5	11.1	14.5	15	14
La moyenne de la partie racinaire (cm) : 13.70												

T₀

Le témoin												
La partie aérienne (cm)	10.7	10.6	10.9	9.9	11.2	8.2	9.6	11.4	11	10.4	10.6	12
La moyenne e la partie aérienne (cm) :10.54 cm												
Nombre des racines	3	3	4	4	4	4	3	4	5	4	6	4
La plus longue racine (cm)	11.2	14.1	11	13	13.6	10.5	1.3	16.8	16.3	13	14	14
La moyenne de la partie racinaire (cm) : 13.21cm												

T₁₅

Atténuation naturelle pétrole												
La partie aérienne (cm)	0.9	5.3	3	1.9	4.8	5	3.5	/	7.5	1	1.7	3
La moyenne e la partie aérienne (cm) : 3.40 cm												
Nombre des racines	2	4	5	4	4	4	3	/	4	5	4	4
La plus longue racine (cm)	3.4	4	4.5	2.6	3	3.9	4.8	/	4.5	5	4.7	3
La moyenne de la partie racinaire (cm) : 3.92 cm												

T₁₅

Bioaugmentation pétrole												
La partie aérienne (cm)	4.4	2	1.2	5.4	4.1	3.9	2.8	1.8	6.2	7	6.3	6.4
La moyenne e la partie aérienne (cm) : 4.29 cm												
Nombre des racines	4	4	4	5	4	5	4	4	4	5	4	5
La plus longue racine (cm)	6.5	4.6	5.5	5.9	7.2	6.3	5.9	3.8	8.2	8.4	7.2	6.9
La moyenne de la partie racinaire (cm) : 6.26 cm												

T₁₅

Atténuation naturelle kérosène												
La partie aérienne (cm)										0.4		0.3
La moyenne de la partie aérienne : 0.058 cm												
Nombre des racines			1	1						1	1	1
La plus longue racine (cm)			0.2	0.3					0.3	0.4	0.3	0.3
La moyenne de la partie racinaire (cm) : 0.3 cm												

T₁₅

Bioaugmentation kérosène												
La partie aérienne (cm)												1.6
La moyenne de la partie aérienne : 0.13 cm												
Nombre des racines				1	1	1				1	1	1
La plus longue racine (cm)				0.2	0.6	0.40				0.3	0.7	0.3
La moyenne de la partie racinaire (cm) : 0.20 cm												

T₁₅

Le témoin												
La partie aérienne (cm)	11.9	13	12.7	12.1	11.5	14.1	14.3	13.7	13.1	12.7	14.5	14.4
La moyenne e la partie aérienne (cm) : 13.16 cm												
Nombre des racines	4	5	4	4	5	4	4	4	4	5	4	4
La plus longue racine (cm)	12	17	18	14.2	17.5	18.5	19.2	17.5	6	19	19.2	19.4
La moyenne de la partie racinaire (cm) : 16.68												

T₃₀

Atténuation naturelle pétrole												
La partie aérienne (cm)	10.6	8.1	10.9	15.4	12.2	3.2	4	9.2	9.7	8.1	8.1	8.6
La moyenne e la partie aérienne (cm) :9 cm												
Nombre des racines	5	4	4	6	4	4	4	3	4	5	4	4
La plus longue racine (cm)	9.2	11	10.4	9.2	10.4	6.3	9	9	7	8.4	7.3	7.4
La moyenne de la partie racinaire (cm) : 8.71 cm												

T₃₀

Bioaugmentation Pétrole												
La partie aérienne (cm)	6.50	9	1.9	9.6	3.4	/	6.7	6.6	7	9.60	10.20	9
La moyenne e la partie aérienne (cm) : 7.22 cm												
Nombre des racines	4	4	4	4	5		4	4	4	4	4	4
La plus longue racine (cm)	6	5.6	7.2	7	6	/	9.5	6.7	9.7	3.4	12	10.9
La moyenne de la partie racinaire (cm) : 7.37 cm												

T₃₀

Atténuation naturelle Kérosène												
La partie aérienne (cm)	0.2	0.3		4.8	0.4	2	0.5	0.7	0.3		1	2.1
La moyenne e la partie aérienne (cm) :1.025 cm												
Nombre des racines	4	4		4	4	3	4	4	1		4	4
La plus longue racine (cm)	0.5	1	0.8	0.9	0.8	1.4	1	1.2	1.6		1	1.4
La moyenne de la partie racinaire (cm) : 0.96 cm												

T₃₀

Bioaugmentation kérosène												
La partie aérienne (cm)				0.8		0.7		1.1				
La moyenne e la partie aérienne (cm) : 0.21 cm												
Nombre des racines		3	3	4		4		4				3
La plus longue racine (cm)		1.2	0.6	1		1.2		1.4				1
La moyenne de la partie racinaire (cm) : 0.39 cm												

T₃₀

Le témoin												
La partie aérienne (cm)	12.7	11.6	15.1	13	12	10.7	12.1	12.7	12.1	14.7	14.7	12.9
La moyenne de la partie aérienne (cm) =12.85 cm												
Nombre des racines	3	4	4	4	4	4	4	5	4	5	5	5
La plus longue racine (cm)	14.2	13.2	9.7	12.2	13.4	11	14.5	14.5	16.2	11.4	11.5	11.6
La moyenne de la partie racinaire (cm) : 12.78 cm												

T₄₅

Atténuation naturelle Pétrole												
La partie aérienne (cm)	8.4	10	4.9	10.2	7.1	8.2	8.5	9.5	6.9	11	10	7.5
La moyenne de la partie aérienne (cm) : 8.51 cm												
Nombre des racines	4	5	3	7	4	4	4	5	5	3	5	4
La plus longue racine (cm)	6.7	8.5	7	10.5	7.5	8.1	9.8	7.4	6.8	9	9.5	11
La moyenne de la partie racinaire (cm) : 8.48 cm												

T₄₅

Bioaugmentation pétrole												
La partie aérienne (cm)	8.5	8	10	9.5	9	11	11.5	8	8	9.5	8.7	11
La moyenne de la partie aérienne (cm) : 9.39 cm												
Nombre des racines	4	4	4	3	4	4	5	4	4	4	3	5
La plus longue racine (cm)	7.2	11.6	10.6	11.4	9.7	11.7	13.2	10.5	9.7	10.2	11.5	12
La moyenne de la partie racinaire (cm) : 10.77 cm												

T₄₅

Atténuation naturelle kérosène												
La partie aérienne (cm)	0.5	8	2.5	5	5.3	7.7	6.1	3.5	2.5	3.7	4	6.5
La moyenne de la partie aérienne (cm) : 4.60 cm												
Nombre des racines	1	4	4	4	4	5	4	3	5	3	4	4
La plus longue racine (cm)	0.6	5.8	2	2.1	2.1	5.6	5	2.8	3.1	3.1	3	3
La moyenne de la partie racinaire (cm) : 3.18 cm												

T₄₅

Bioaugmentation kérosène												
La partie aérienne (cm)	6	4.6	5.8	5.2	6.5	7	7.1	8	7.1	7.4	5.8	4.5
La moyenne de la partie aérienne (cm) : 6.25 cm												
Nombre des racines	5	4	3	4	4	4	4	4	4	4	3	4
La plus longue racine (cm)	5.1	3.4	5.1	5.1	2.5	5.7	4.1	3.8	4.5	3.8	4	3.6
La moyenne de la partie racinaire (cm) : 4.22 cm												

T₄₅

**Essai de bioépuration des sols contaminés aux hydrocarbures pétroliers par
Pseudomonas aeruginosa et *Serratia marcescens***

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie moléculaire des microorganismes

Résumé

L'accumulation des hydrocarbures pétroliers dans le sol présente un véritable danger pour l'environnement et la santé humaine. La bioremediation est une option qui offre la possibilité de dégrader ces polluants ou de les rendre moins toxiques, en se basant sur l'activité épuratrice naturelle des microorganismes.

L'objectif de cette étude est dépolluer deux types de sol contaminés par le pétrole et le kérosène en faisant appel à la flore indigène et à des souches bactériennes exogènes isolées à partir d'un site contaminé par les hydrocarbures.

Au total, cinq bacs de sol sont artificiellement pollués par le pétrole et le kérosène séparément, dont deux bacs ont subi un traitement de bioaugmentation, deux autres non traités et enfin, un bac est réservé à un sol témoin non pollué.

Un consortium bactérien composé de trois souches est injecté dans les traitements de bioaugmentation. Les souches inoculées sont une *Serratia marcescens* et deux *Pseudomonas aeruginosa*.

L'efficacité de cette démarche est évaluée par le suivi de la charge microbienne UFC/g et surtout d'un test de germination chaque 15 jours durant les 45 jours d'expérimentation.

Les résultats obtenus après 45 jours sont importants et montrent des indices de germination de 66.35%, 84.27% pour l'atténuation naturelle, et la bioaugmentation des sols pollués par le pétrole et 24.33%, 33% pour l'atténuation naturelle et la bioaugmentation des sols pollués par le kérosène respectivement.

Mots clés : bioaugmentation, pétrole, kérosène, grains d'orge, flore indigène, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Microbiologie.

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Mme Bouchloukh Warda (maitre assistante <<A>> à UFC)

Rapporteuse : Mme Guergouri Ibtissem (maitre assistante <<A>> à UFC)

Examinatrice : Mme Gaci Meriem (maitre assistante <<A>> à UFC)

Date de soutenance : 04 /07/2019